

Aus dem Institut für Biochemie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

# **Prozessierung des pp89 MCMV MHC Klasse I Epitops durch das Proteasom**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Antje Voigt  
aus Stendal

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Peter M. Kloetzel  
2. PD Dr. rer. nat. S. Stevanovic  
3. PD Dr. rer. nat. R. Stohwasser

eingereicht: 01.10.2003

Datum der Promotion: 19.04.2004

# Inhaltsverzeichnis

Abstrakt .....	iv
Abstract .....	v
Abkürzungsverzeichnis .....	vi
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Proteasom .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Aufbau und katalytische Aktivität des 20S Proteasoms .....	1
1.1.2 Das Immunoproteasom .....	4
1.1.3 Der Proteasomaktivator PA28 .....	5
1.1.4 Der 19S Regulator und das 26S Proteasom .....	7
1.1.5 Das Ubiquitin- Proteasom- System .....	8
<b>1.2 Die Ubiquitin Kaskade .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3 ODC- Abbau durch das 26S Proteasom .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Antigenprozessierung durch das 26S Proteasom .....</b>	<b>14</b>
1.4.1 Der MHC Klasse I- Weg der Antigenprozessierung .....	14
1.4.2 Das Cytomegalievirus - Prozessierung eines spezifischen viralen Epitops .....	17
1.4.2.1 Das humane Cytomegalievirus .....	17
1.4.2.2 Das murine Cytomegalievirus und pp89 .....	18
<b>1.5 Zielsetzung .....</b>	<b>21</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Geräte .....	23
2.1.2 Reagenzien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien .....	23
2.1.3 Kits .....	24
2.1.4 Oligonucleotide / Primer .....	24
2.1.5 cDNA-Konstrukte .....	25
2.1.6 Antikörper .....	25
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	25
2.2.1.1 Amplifikation von DNA durch PCR .....	25
2.2.1.2 Amplifikation von RNA durch RT-PCR .....	25
2.2.1.3 DNA- Gelelektrophorese .....	26
2.2.1.4 Extraktion von DNA- Fragmenten aus dem Agarosegel .....	26
2.2.1.5 Bestimmung der DNA- und RNA- Konzentration .....	26
2.2.1.6 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen .....	26
2.2.1.7 Dephosphorylierung von DNA .....	26
2.2.1.8 Ligation von Insert- DNA in Vektor- DNA .....	27
2.2.1.9 Herstellen kompetenter Zellen (Rubidium- Chlorid- Methode) .....	27
2.2.1.10 Transformation von E. coli mit Plasmid- DNA .....	27
2.2.1.11 Plasmidisolation aus E. coli .....	28
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden .....	28
2.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	28
2.2.2.2 TCA/ NaDoc- Fällung von Proteinen .....	29
2.2.2.3 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	29

2.2.2.4	<i>Elektrotransfer von Proteinen aus SDS- PAG auf Immobilon Membran</i>	30
2.2.2.5	<i>Identifizierung von Proteinen mittels Immunodetektion (ECL)</i>	30
2.2.2.6	<i>Coomassiefärbung von SDS- Minigelen</i>	31
2.2.2.7	<i>Native Gelelektrophorese und Substrat- Overlay</i>	31
2.2.2.8	<i>Aufreinigung von pp89 (56kDa)</i>	32
2.2.2.9	<i>Proteinsequenzierung</i>	33
2.2.2.10	<i>CD- Spektrum</i>	33
2.2.2.11	<i>Aufreinigung von ODC/pp89 Fusionsprotein (77kDa)</i>	33
2.2.2.12	<i>Aufreinigung von Antizym</i>	34
2.2.2.13	<i>Aufreinigung von 20 S Proteasomen</i>	34
2.2.2.14	<i>Aufreinigung von 26S Proteasomen</i>	36
2.2.2.15	<i>Aufreinigung von Immunoproteasomen und PA28</i>	37
2.2.2.16	<i>Aufreinigung von His-Ubi mit Ni- NTA-Agarose aus B8 Zell- Lysaten</i>	37
2.2.2.17	<i>Proteolytische Verdaus mit mCMV pp89</i>	37
2.2.2.18	<i>Proteolytische Verdaus mit dem ODCpp89 Fusionsprotein</i>	38
2.2.2.19	<i>Analytische HPLC</i>	38
2.2.2.20	<i>Massenspektrometrie</i>	39
2.2.3	<b>Zellkultur</b>	39
2.2.3.1	<i>Verwendete murine Zelllinien</i>	39
2.2.3.2	<i>Lösungen für die Zellkultur</i>	39
2.2.3.3	<i>Kultur von adhärenenten Zellen</i>	39
2.2.3.4	<i>Einfrieren und Auftauen</i>	40
2.2.3.5	<i>Kalziumphosphat- Transfektion adhärenter Zellen</i>	40
2.2.3.6	<i>Lyse der kultivierten Zellen</i>	40
2.2.3.7	<i>Test der Transfektanten</i>	41
2.2.3.8	<i>Pulse-Chase-Experimente</i>	41
2.2.4	<b>Immunbiologische Methoden</b>	41
2.2.4.1	<i>Kultivierung der pp89 spezifischen zytotoxischen T-Zellen</i>	41
2.2.4.2	<i>Klonierung der pp89 spezifischen zytotoxischen T-Zellen</i>	42
2.2.4.3	<i>Zytotoxischer T Zell Assay</i>	42
2.2.4.4	<i>Immunopräzipitation</i>	42
3	<b>Ergebnisse</b>	44
3.1	<b>Abbau und Prozessierung des rekombinanten pp89</b>	44
3.1.1	<i>Klonierung des rekombinanten pp89</i>	44
3.1.2	<i>Expression und Aufreinigung des rekombinanten pp89</i>	45
3.1.3	<i>In vitro Verdau des rekombinanten pp89 durch das Proteasom</i>	47
3.1.4	<i>CD- Spektrum des rekombinanten pp89</i>	52
3.2	<b>Polyubiquitinierung des pp89 Abbaus durch das 26S Proteasom <i>in vivo</i></b>	54
3.2.1	<i>Transiente Transfektion von HA- bzw. His- markiertem Ubiquitin in B8 Zellen</i>	54
3.2.2	<i>Immunopräzipitation von pp89</i>	57
3.3	<b>Abbau des ODCpp89 Fusionsproteins durch das 26S Proteasom</b>	60
3.3.1	<i>Klonierung des rekombinanten ODCpp89 Fusionsproteins</i>	61
3.3.2	<i>Expression und Aufreinigung des rekombinanten ODCpp89Fusionsproteins</i>	62
3.3.3	<i>Expression und Aufreinigung von Antizym</i>	62
3.3.4	<i>In vitro Verdau des rekombinanten ODCpp89 durch das 26S Proteasom</i>	63
4	<b>Diskussion</b>	66
4.1	<b>Prozessierung des rekombinanten pp89</b>	66
4.1.1	<i>Abbau des rekombinanten pp89 durch das 20S Proteasom</i>	66
4.1.2	<i>Einfluss von PA 28 auf den Abbau von pp89 durch das 20S Proteasom</i>	70

4.1.3	Abbau des rekombinanten pp89 durch das Immunoproteasom .....	72
<b>4.2</b>	<b>Polyubiquitinierung als Abbausignal des pp89 <i>in vivo</i>?</b> .....	<b>72</b>
4.2.1	In vivo Analysen ergeben keinen Anhalt für eine Ubiquitinierung des pp89 .....	73
4.2.2	DRiPs - Ursprung antigenen Peptide .....	73
4.2.3	Polyubiquitinierung als essentielles Degradationssignal?.....	74
4.2.4	Auf der Suche nach alternativen Degradationssignalen .....	76
<b>4.3</b>	<b>Modulation der proteasomalen Aktivität- ein zweiseitiges Modifier Modell...</b>	<b>80</b>
<b>4.4</b>	<b>Alternative Therapieregime der CMV Erkrankung .....</b>	<b>81</b>
Zusammenfassung .....		82
Bibliographie.....		83
Danksagung .....		91
Tabellarischer Lebenslauf .....		92
Erklärung an Eides Statt.....		93

## Abstrakt

Das Proteasom ist eine ATP- abhängige Protease, die sich aus vielen Untereinheiten zusammensetzt. Es ist für die Generierung der MHC Klasse I- restringierten Peptide verantwortlich, die nach Komplexbildung mit MHC Klasse I- Haplotypen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Nicht- funktionelle Proteine, die als so genannte defective ribosomal products (DRIP) bezeichnet werden, stellen eine wichtige Quelle für die Generierung von antigenen Peptiden, insbesondere jedoch von viralen Peptiden dar. Generell wird die Lehrmeinung vertreten, dass der Abbau von polyubiquitinierten Proteinen durch das 26S Proteasom zur Generierung von MHC Klasse I- Liganden führt. Allerdings ist weiterhin unklar, ob virale Proteine Ubiquitin- abhängig vom Proteasom abgebaut werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Proteasom- abhängige Abbau des mCMV ie pp89 Proteins vor allem hinsichtlich einer potentiellen Ubiquitinierung untersucht werden. Dazu wurden zunächst Konstrukte sowohl für ein rekombinantes pp89 (rek pp89) als auch für ein ODCpp89 Fusionsprotein entworfen. Somit konnten sowohl der *in vitro* Abbau dieser Proteine als auch die Prozessierung des spezifischen MHC Klasse I- H-2L<sup>d</sup> Epitops verfolgt werden. Experimente zum Nachweis von Ubiquitin- Protein- Konjugaten wurden *in vivo* mit pp89 cDNA stabil transfizierten Mausfibroblasten (B8 Zellen) durchgeführt.

Die experimentellen Daten sprechen für einen schnellen *in vitro* Abbau des rek pp89 durch das 20S Proteasom. Das MHC Klasse I- pp89 Epitop bzw. dessen 11mer Precursorpeptid wurden dabei mit hoher Präzision generiert. Spezifische CTL Assays weisen auf die Generierung des korrekten Epitops bzw. des Precursors hin. Nach Verdau des ODCpp89 Fusionsproteins durch 26S Proteasomen in Anwesenheit von Antizym konnten mit diesem Test ebenfalls das 9mer Epitop respektive der 11mer Precursor nachgewiesen werden. Eine potentielle Ubiquitinierung des pp89 wurde *in vivo* in Zellkulturen untersucht. Nach Gabe von Proteasomeninhibitoren zu Mausfibroblasten konnte eine starke Akkumulierung von Ubiquitin- Konjugaten beobachtet werden. Allerdings konnte in den verschiedenen Versuchsansätzen kein Nachweis von pp89- Ubiquitin- Konjugaten erbracht werden. Demzufolge ist für die Generierung von viralen Epitopen ein Proteasom- abhängiger, aber Ubiquitin- unabhängiger Abbauweg denkbar.

Schlagwörter:

Proteasomen

MHC Klasse I- Antigenprozessierung

MCMV pp89

Ubiquitin

## Abstract

The proteasome, an ATP-dependent, multisubunit protease, is responsible for the generation of most MHC class I restricted epitopes presented on the cell surface. Non-functional proteins, also known as defective ribosomal products (DRiP), represent an important source for the generation of antigenic peptides in general and of viral epitopes in particular. It is widely accepted that the degradation of polyubiquitinated proteins by the 26S proteasome is a prerequisite for the generation of MHC class I ligands. However, the ubiquitin dependence for the proteasomal degradation of viral proteins is an issue so far unresolved. Therefore, the aim of this study was to analyze the proteasomal degradation of the mCMV ie pp89 in respect to an anticipated ubiquitinylation. Thus, a recombinant pp89 (recpp89) as well as an ODCpp89 fusion protein were generated. The *in vitro* processing of these proteins and the generation of a MHC class I H-2L<sup>d</sup> epitope by proteasomes was further studied. Murine fibroblast cell lines (B8 cells) were used to analyze any *in vivo* evidence for potentially existing ubiquitin-protein conjugates.

The experiments show that the recpp89 protein is rapidly degraded *in vitro* by the 20S proteasomes and that the correct MHC class I pp89 epitope or its 11mer precursor are generated with high fidelity. Furthermore, CTL assays, indicating the generation of the specific pp89 epitope or the 11mer precursor, also suggested a 26S proteasome-dependent degradation of the mCMV pp89-ODC fusion protein in the presence of antizyme. Treating cell cultures with proteasome inhibitors resulted in a significant accumulation of ubiquitin-conjugates *in vivo*. However, higher molecular weight pp89-ubiquitin conjugates were not detectable throughout the entire experimental set-up. Consequently, a proteasome-dependent, but ubiquitin-independent pathway can be postulated for the generation of viral epitopes.

### Keywords:

Proteasomes

MHC class I antigen processing

MCMV pp89

Ubiquitin

## Abkürzungsverzeichnis

AAA- ATPase	ATPases associated with a variety of cellular processes
AAF-CMK	Alanin-Alanin-Phenylalanin-Carboxymethylketon
Abb.	Abbildung
AIDS	aquired immunodeficiency syndrome
Amp	Ampicillin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BrAAP	Branched chain aminoacid preference
BSA	Bovines Serumalbumin
c20S	konstitutives Proteasom 20S
CD	cluster of differentiation bzw. circular dichroism (CD- Spektrum)
CdK	cyclin dependent kinase
cDNA	complementary DNA
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHT	Chymotrypsin- ähnlich
CID	cytomegalic inclusion disease
Cr	Chrom
C-terminal	Carboxyterminus
CTL	zytotoxische T- Lymphozyten
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxy ribonucleic acid)
DRiP	defective ribosomal product
E6-AP	E6 associated protein
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotic translational initiation factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAP1	ER Aminopeptidase 1
ESI MS/MS	Electrospray Ionisation Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
FKS	fetales Kälberserum
FMP	Forschungszentrum für Molekulare Pharmakologie
FPLC	fast protein liquid chromatography
gp	Glykoprotein
H	Helix
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HBV	Hepatitis B Virus
hCMV	humanes Cytomegalievirus
HCV	Hepatitis C Virus
HECT	homologous to E6-associated protein carboxy terminus
Her_2	Herceptin_2
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HLA	human leucocyte antigen
hsp	heat shock protein
i20S	Immunoproteasom 20S
ie	immediate early
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
LB	Luria- Bertani- Medium
LCMV	Lymphozytotropes Choriomenigitis Virus
LMP	low molecular weight protein
M	Molar
mA	Milliampere
MBP	Maltose binding protein



mCi	Milli Curie
mCMV	murines Cytomegalievirus
MDC	Max- Delbrück- Centrum
mDRIP	misfolded full-length DRiP
MECL	multicatalytic endopeptidase complex
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
Ni- NTA	Nickel- nitrilotriacetic acid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP40	Nonidet P40
NS1/NS2	non-structural protein 1/2
N- terminal	Aminotermminus
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
ODC	Ornithindecarboxylase
PA	Proteasomaktivator
PAG(E)	Polyacrylamidgel (elektrophorese)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PGPH	Peptidyl-glutamyl-peptid Hydrolase
PMSF	Phenylmethylsulfonfluorid
pp89	phosphoprotein 89kDa
REG	Regulator
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RP-HPLC	Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography
Rpn	regulatory particle, non- ATPase
Rpt	regulatory particle, triple-A protein
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulphate
T	Trypsin- ähnlich, Threonin
TAP	transporter associated with antigen presentation
TBS	Tris Buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
tDRiP	termination product DRiP
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
ts85	temperature sensitive (mutant) 85
TTP II	Tripeptidylpeptidase II
TZR	T-Zellrezeptor
U	Unit
Ub, Ubi	Ubiquitin
UE	Untereinheit
üN	über Nacht
US / UL	Untereinheit small /large (bezogen auf hCMV Genom)
V	Volt
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

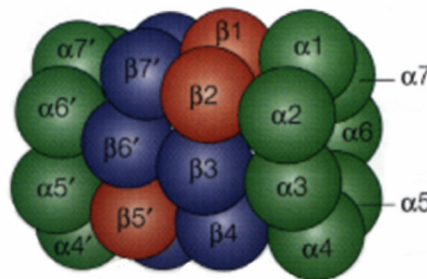
# 1 Einleitung

## 1.1 Das Proteasom

Eine der wichtigsten zellulären Funktionen ist zweifelsohne der regulierte und kontrollierte Abbau von endogenen Proteinen, um einerseits die Homeostase der Zelle zu gewährleisten, andererseits auch Proteine zu definierten Zeitpunkten regulieren zu können. Eine grundlegende Voraussetzung dazu ist eine Kompartimentierung in zellulären Substrukturen, wobei die Autokompartimentierung, die geordnete Zusammenlagerung von verschiedenen Proteasen zu einem zylinderförmigen Komplex, sich als evolutionär stabiles Konzept des kontrollierten Proteinabbaus herauskristallisiert hat. In allen Domänen des Lebens, in Bakterien, Archaeobakterien und Eukaryonten konnte dieses Konzept bestätigt werden. In Archaeobakterien und Eukaryonten ist es vielmehr gelungen, eine „multikatalytische Proteinase“ zu identifizieren, die wenige Jahre später in „Proteasom“ umbenannt wurde (Dahlmann 1988, Arrigo 1988, Dahlmann 1989, Baumeister 1998).

### 1.1.1 Aufbau und katalytische Aktivität des 20S Proteasoms

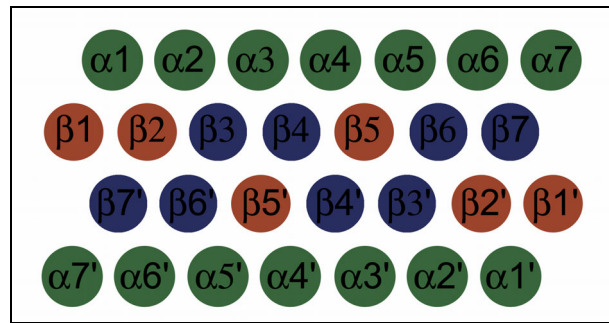
20S Proteasomen setzen sich aus vier aneinander gelagerten Ringen zusammen, die wiederum jeweils aus einem Konglomerat von 7 evolutionär verwandten, aber nicht identischen Untereinheiten (UE) bestehen. Eukaryonten weisen 2 Kopien von 14 verschiedenen Untereinheiten auf, die aufgrund ähnlicher Sequenzen  $\alpha$ - und  $\beta$ - UE zugeordnet sind. Die  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha 1$ - $\alpha 7$ ) bilden die beiden äußeren, die  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta 1$ - $\beta 7$ ) die beiden inneren Ringe. Durch diese  $\alpha 7 \beta 7 \beta 7 \alpha 7$ -Anordnung formiert sich ein Zylinder von 15nm Länge, der einen Durchmesser von 11nm aufweist. Der Zylinder schließt 3 interne Kavitäten ein (vgl. Abb. 1), wobei die innere durch die beiden benachbarten  $\beta$ -Ringe, die äußeren Vorkammern jeweils durch Anteile eines  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rings eingeschlossen werden (Kopp 1993, 1997)



**Abb. 1: Dreidimensionales Modell des *S. cerevisiae* 20S Proteasoms.** In grün dargestellt die 7  $\alpha$ -Untereinheiten, in blau und rot die 7 verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten, wobei sowohl die Ringstruktur der zusammen gelagerten  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ - Untereinheiten als auch die Fassform des Komplexes veranschaulicht werden. Rot hervorgehobene  $\beta$ -Untereinheiten (vgl. Abb.2) weisen katalytische Aktivität auf (aus Kloetzel 2001).

Wie aufgrund der ähnlichen Primärstruktur vorherzusehen, weisen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten vergleichbare Sekundärstrukturen auf (vgl. Abb. 3). Sie bestehen aus jeweils 2 fünfsträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die an jeder Seite von  $\alpha$ -Helices flankiert sind. Die Helices H1 und H2 vermitteln die Wechselwirkungen zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ring. H3 und H4 auf der gegenüberliegenden Seite interagieren mit den beiden zentralen  $\beta$ -Ring. In der Struktur der  $\alpha$ -UE findet sich zusätzlich eine  $\alpha$ -Helix H0, die aus für die einzelnen UE spezifischen, N- terminalen Verlängerungen der  $\alpha$ -Untereinheiten gebildet wird und in einer Furche des  $\beta$ -Faltblatts liegt. Die Bedeutung dieser zusätzlichen  $\alpha$ -Helix liegt, besonders bedingt durch die Position am äußeren Ende des Zylinders, in der Translokation von Substraten in das Proteasom oder in der Interaktion des 20S mit Regulatorkomplexen. Röntgenstrukturanalysen mutierter Proteasomen zufolge ist ein einziger Aspartatrest an Position 9 (Asp-9) der  $\alpha$ 3-Untereinheit dafür verantwortlich, den Zugang in den Proteasekomplex geschlossen zu halten bzw. zu öffnen (Daten für *S. cerevisiae*). Bei den  $\beta$ -Untereinheiten werden die Prosequenzen am Aminoterminal, die bis zu 80 Aminosäuren lang sein können, während der Assemblierung und Reifung des Proteasoms autokatalytisch entfernt, wodurch die innere Kavität frei zugänglich wird und die katalytischen Zentren „aktiviert“ werden (Löwe 1995, Groll 1997, Groll 2000).

Die katalytischen Zentren befinden sich innerhalb der zentralen Kammer des 20S Proteasoms. Das Proteasom ist als N- terminale nukleophile Hydrolase charakterisiert worden (Brannigan 1995). Nach autokatalytischer Entfernung der Prosequenzen befindet sich ein Threonin am N-Terminus der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten (Thr-1), das als essentielles Nukleophil und Protonenakzeptor fungiert (Löwe 1995, Seemüller 1995). Lactazystin, ein in seiner aktiven Form an Thr-1 kovalent bindendes Antibiotikum, führt zu einer Hemmung der proteolytischen Aktivität des Proteasoms, insbesondere der Spaltung nach hydrophoben Aminosäuren (Fenteany 1995, Rock & Goldberg 1999). Neben dem Thr-1 sind weitere AS in den katalytischen Zentren der  $\beta$ -UE erforderlich, um eine effiziente Proteolyse zu gewährleisten: Lysin an Position 33 und Glutamat an Position 17. Dem Lys-33, respektive der N- terminalen Aminogruppe des Thr-1 werden eine Protonendonator- bzw. Protonenakzeptorrolle zugeschrieben, das Glu-17 dürfte die protonierte Form dieser Gruppen stabilisieren (Schmidtke 1996). In Mutationsanalysen (Thr1→Ala1 bzw. Lys33→Ala33) führten die T1A- bzw. K33A-Mutanten zu einer unvollständigen Prozessierung der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten, woraus verschiedene Primärstrukturen der  $\beta$ -Untereinheiten mit deutlich reduzierter katalytischer Funktion resultierten (Schmidtke 1996, Heinemeyer 1997, Dick 1998).



**Abb. 2: Anordnung der 28 Untereinheiten des eukariotischen 20S Proteasoms** nach Kristallstrukturanalysen des Hefeproteasoms (Groll 1997) und Immunelektronenmikroskopie (Kopp 1997). In Mutationsanalysen wurden proteolytische Aktivitäten für β1, β2 und β5 (rot markiert, siehe Tab.1) nachgewiesen. In blau die katalytisch inaktiven β-Untereinheiten, in grün die α-Untereinheiten.

Im Gegensatz zu Archaeobakterien (*T. acidophilum*), bei denen alle β-Untereinheiten proteolytische Aktivität zeigen, ist die katalytische Funktion bei Eukaryonten auf die 3 β-UE, β1, β2 und β5 restringiert (vgl. Abb. 1, 2).

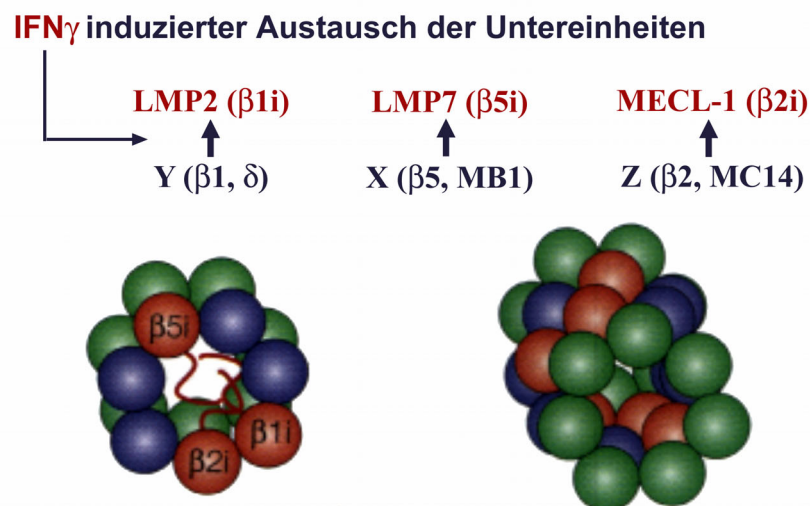
Mit Hilfe von fluorogenen Peptidsubstraten konnten diesen aktiven β-Untereinheiten bestimmte Präferenzen der Peptidhydrolyse in Abhängigkeit von den AS an Position 1 zugeschrieben werden (vgl. Tab.1). Hingegen ist die Enzymspezifität bei Proteinen, also physiologischen Substraten in Mammalia- Proteasomen weitaus geringfügiger ausgeprägt (Kisselev 1999, Akopian 1997).

Gen	β-Untereinheit	Katalytische Aktivität	Erläuterung	Peptidsubstrat
PSMB 6	β1 (Y, δ)	PGPH, BrAAP	Spaltung nach sauren AS und AS mit verzweigten Seitenketten	Suc-L-L-E-β-NA (PGPH)
PSMB 9	β1i (LMP 2)	ChT	Spaltung nach hydrophoben AS	Suc-L-L-V-Y-AMC
PSMB 7	β2 (Z, MC14, ζ)	T	Spaltung nach basischen AS	BZ-V-G-R-AMC
PSMB 10	β2i (MECL-1)	T	Spaltung nach basischen AS	BZ-V-G-R-AMC
PSMB 5	β5 (X, MB1, ε)	ChT	Spaltung nach hydrophoben AS	Suc-L-L-V-Y-AMC
PSMB 8	β5i (LMP 7)	ChT	Spaltung nach hydrophoben AS	Suc-L-L-V-Y-AMC

**Tab. 1: Katalytische Aktivitäten der einzelnen β-Untereinheiten.** PGPH: Peptidyl-glutamyl-peptid Hydrolase, ChT: Chymotrypsin- ähnlich, T: Trypsin- ähnlich, BrAAP: Branched chain aminoacid preference (Heinemeyer 1997, Orlowski 1993, 2000). Mit „i“ benannte Untereinheiten sind Bestandteile des Immunoproteasoms.

### 1.1.2 Das Immunoproteasom

Eine der Funktionen des Proteasoms besteht in der Antigenprozessierung. In dieser Eigenschaft ist es direkt in den MHC Klasse I- abhängigen Weg der Immunabwehr integriert. Interferon  $\gamma$ , ein pleiotropes Zytokin, induziert unter anderem einen Austausch der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten gegen die Immununtereinheiten LMP2, LMP7 und MECL-1 (vgl. Abb. 3; Rock & Goldberg 1999). Der konsekutive Einbau dieser Immununtereinheiten  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i und  $\beta$ 5i bedarf jedoch der *de novo* Assemblierung des Proteasoms (vgl. Abb. 3). Die Untereinheiten stehen dabei in Wechselwirkung untereinander, so ist die Integration der  $\beta$ 2i-UE von der Inkorporation der  $\beta$ 1i-UE in den Präproteasomenkomplex abhängig. Die effiziente Reifung des Immunoproteasoms in Form des  $\beta$ 1i-,  $\beta$ 2i-Präproteasomenkomplexes wiederum erfordert die Anwesenheit bzw. Inkorporation von  $\beta$ 5i (Groettrup 1996, Griffin 1998, Schmidt 1997, Tanaka 1998).



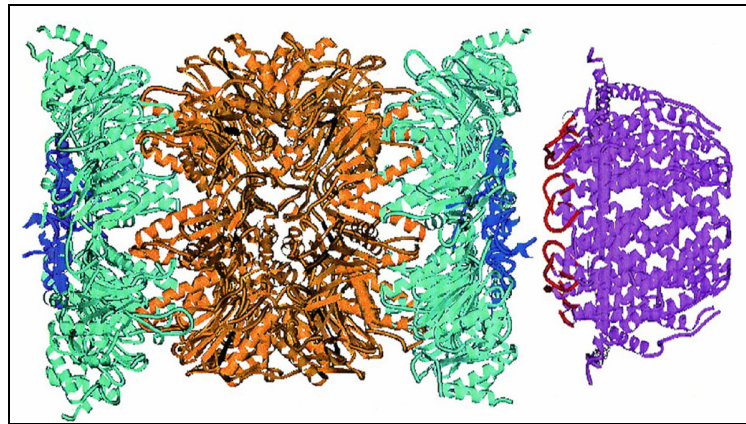
**Abb. 3: Immunoproteasom.** Der durch IFN $\gamma$  induzierte Austausch der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten erfordert die *de novo* Assemblierung des 20S Core- Komplexes. In der linken Abbildung ist ein Intermediat, bestehend aus einem heptameren  $\alpha$ -Ring und 7  $\beta$ -Untereinheiten, dargestellt. Die Immununtereinheiten sind rot mit  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i und  $\beta$ 5i gekennzeichnet, wobei gleichzeitig noch die Prosequenzen (rote Fäden) sichtbar sind, die während der Maturierung prozessiert werden. Rechts hingegen das reife 20S Immunoproteasom (in Anlehnung an Kloetzel 2001).

Das Proteasom schneidet Proteine bzw. Peptide in einer prozessiven Weise. Es entstehen dabei hauptsächlich Peptidfragmente einer Länge von 4 bis 24 Aminosäuren. So generiert das 26S Proteasom in 10% der Fälle Octapeptide, in 70% kleinere und in 20% der Fälle größere Fragmente. Die durchschnittliche Länge der Fragmente bei konstitutiven 20S Proteasomen beträgt 7.4 AS, die der von Immunoproteasomen generierten Fragmente dagegen 8.6 AS. Der Proteinabbau erfolgt zufällig, bis die Produkte eine Größe erreicht haben, die die Diffusion aus dem 20S Core-Komplex zulässt. Einige Proteine werden jedoch nicht vollständig abgebaut. Als Ausnahme sei der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B erwähnt, dessen N- terminales Fragment (50kDa) nach dem proteasomalem Abbau des p105

Vorläuferproteins entsteht und die aktive Form des Transkriptionsfaktors darstellt (Rock & Goldberg 1999, Toes 2001). Immunoproteasomen zeigen auf die Generierung bestimmter viraler Epitope einen positiven Effekt. Sie fördern Peptidhydrolysen nach hydrophoben und basischen Aminosäuren (ChT, T) (Sijts 2000a, Sijts 2000b, Schwarz 2000) und führen Schnitte nach sauren Aminosäuren (PGPH) vermindert aus (Gaczynska 1994). Insbesondere korreliert die Schnittpräferenz an Position 1 der Substrate nach hydrophoben Resten mit dem Konzept, dass hydrophobe Ankerreste am C- Terminus der Epitope in der MHC Klasse I- Bindungstasche spezifisch binden (vgl. Abb. 9). Antigen präsenterende Zellen (APZ), wie dendritische Zellen, exprimieren in vergleichsweise hohem Maße Immunoproteasomen (Toes 2001, Falk 1991, 1993). Die genauen molekularen Mechanismen der Generierung dieser veränderten Peptidmuster sind noch nicht vollständig bekannt. Allerdings werden durch Inkorporation der Immununtereinheiten bedingte filigrane Änderungen der Gesamtstruktur des 20S Komplexes postuliert, die die Schnittpräferenzen beeinflussen können. So wurde beispielsweise im Falle des HBV-Epitops nachgewiesen, dass der  $\beta 1i$ -,  $\beta 2i$ - und  $\beta 5i$ -Einbau für die Antigenprozessierung essentiell ist. Auch  $\beta 5i$ -T1A-Mutanten, d.h. Proteasomen mit einer inaktiven  $\beta 5i$ -Untereinheit, generierten das korrekte Epitop, was auf einen strukturellen Einfluss dieser Untereinheit hindeutet. In  $\beta 1i$ -Mutanten konnten für das murine Cytomegalievirus (vgl. 1.4.2) ähnliche Resultate erzielt werden (Sijts 2000a, Schmidtke 1998). Die erwähnten Konformationsänderungen innerhalb des Immunoproteasoms könnten die Eigenschaften der Substratbindungsregion beeinflussen und so den Zugang zu den verschiedenen aktiven  $\beta$ -Untereinheiten des 20S Komplexes verändern.

### **1.1.3 Der Proteasomaktivator PA28**

Eine weitere durch IFN $\gamma$  induzierbare Komponente des proteasomalen Systems, die die Antigenprozessierung des MHC Klasse I- Wegs beeinflusst, ist der Proteasomaktivator PA28, auch 11S Regulator oder REG genannt (Dubiel 1992, Ma 1992, Realini 1994). Dieser 180-200kDa große Regulator ist aus PA28  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zusammengesetzt, die im Zytosol eine hexamere Ringstruktur PA28( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> bilden. Im Zellkern wurden hexamere Ringe aus 6  $\gamma$ -Untereinheiten, PA28( $\gamma$ )<sub>6</sub>, identifiziert (Ahn 1996, Kuehn 1996, Tanaka 1998). Rekombinant exprimierte PA28 $\alpha$ -Untereinheiten wiederum formieren heptamere Ringe PA28( $\alpha$ )<sub>7</sub>, die entsprechende *in vivo* Komplexe suggerieren (Knowlton 1997, Kloetzel 2001).



**Abb. 4: Proteinstruktur des *S. cerevisiae* 20S Proteasoms (links) und Modell des PA28 (rechts in violett).** 20S:  $\alpha$ -Untereinheiten in grün, N- terminale Sequenzen ( $\alpha$ -Helix H0) in blau;  $\beta$ -Untereinheiten in orange. Jede Untereinheit bildet 5-strängige antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, Flankierung durch  $\alpha$ -Helices. PA28: nahezu ausschließlich  $\alpha$ -Helices. Nach Bindung an 20S öffnet sich der  $\alpha$ -Ring des Proteasoms (Rechsteiner 2000).

Der in Mammalia vorkommende PA28-Komplex hat selbst keine hydrolytische Aktivität, vermag hingegen in *in vitro* Studien in Anwesenheit von 20S Proteasomen den Abbau von fluorogenen Peptiden ATP- unabhängig zu beschleunigen. Das Peptidrepertoire nimmt ebenso zu. Andererseits wird der Abbau von Proteinen oder Ubiquitin- Protein- Konjugaten nicht stimuliert (Ustrell 1995, Groettrup 1995). Für bestimmte Peptidsubstrate (JAK 1 Protein) zeigte sich, dass in Anwesenheit von PA28 Doppelschnitte im Gegensatz zu Einzelschnitten präferiert werden (Dick 1996). Andere Studien implizieren jedoch, dass sich nach Bindung von PA28 die Substrataffinität bei gleich bleibender enzymatischer Aktivität des Komplexes erhöht. Weiterhin werden sowohl die Substrataufnahme als auch die Freisetzung der generierten Fragmente durch PA28 in ihrer Rate beschleunigt (Stohwasser 2000). Der Effekt von PA28 auf die Antigenprozessierung viraler Epitope zeigte einerseits eine vermehrte Generierung verschiedener Epitope, die Rate des Proteinumsatzes hingegen blieb konstant. Jedoch konnte dieser Effekt für andere virale Epitope nicht nachgewiesen werden (van Hall 2000). In Kristallstrukturanalysen wurden PA26-20S Proteasomenkomplexe analysiert (PA26: zum PA28 homologer Komplex aus Trypanosomen) (Whitby 2000). Der Regulator Komplex bindet ATP-unabhängig an die äußeren  $\alpha$ -Ringe des 20S Proteasoms und kann den 19S Regulator an mindestens einer Seite verdrängen, so dass Hybrid- Proteasomen, d.h. asymmetrische Komplexe aus 19S, 20S und PA28, entstehen können.

Wie bereits ausgeführt, sind die N- terminalen Peptidsequenzen der  $\alpha$ -Untereinheiten des 20S Kernkomplexes, insbesondere  $\alpha 3$ , für den verschlossenen Zugang des Proteinasekomplexes verantwortlich (Groll 2000). Nach Bindung von PA28 an das Proteasom werden die aminoterminalen Sequenzen der  $\alpha$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms in den Hohlraum des PA28-Zylinders umgelagert und somit der Zugang für

Substrate in das 20S Proteasom ermöglicht (Whitby 2000, Kopp 2001). Diese offene Konformation des Proteasoms könnte die Freisetzung längerer Peptidfragmente ermöglichen, welche wiederum als N- terminal verlängerte Vorläufer von spezifischen zytotoxischen T- Zellepitopen nicht der sofortigen zellulären Degradation unterlegen wären.

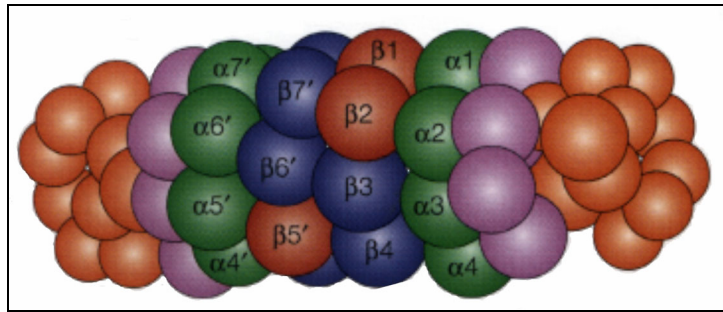
#### **1.1.4 Der 19S Regulator und das 26S Proteasom**

Der kontrollierte Proteinabbau durch Proteasomen wird durch einen anderen Regulator Komplex, den so genannten 19S Regulator oder PA700 (*Proteasomaktivator 700 kDa*) vermittelt. 19S Regulatoren, die haubenartig mit dem 20S Komplex assoziiert sind, binden ubiquitinierte Proteine, deubiquitinieren diese, assistieren bei der Entfaltung und schleusen die Proteine in das Proteasom ein, wo im Anschluss der proteolytische Abbau stattfindet. Jeweils ein 19S Regulator interagiert in einer determinierten Position mit den  $\alpha$ -Ringen des 20S Proteasoms, wobei sich die C2-Symmetrie des 20S Proteasoms durch die entgegengesetzte Orientierung der 19S Einheiten manifestiert (vgl. Abb. 4). Der resultierende proteolytische Komplex ist als 26S Proteasom beschrieben worden (Coux 1996, Glickman 1998a, Walz 1998).

Der 19S Regulator setzt sich aus bis zu 20 verschiedenen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht zwischen 25 und 110kDa zusammen, welche wiederum zwei Subkomplexe, „base“ und „lid“ genannt, bilden (vgl. Abb. 4). Den „base“- Subkomplex bilden sechs ATPasen (S7, S4, S6, S10b, S6', S8), die zur Triple-A Familie (ATPases associated with a variety of cellular activities) zählen und die Nicht- ATPasen S1, S2 und S5a. Die ATPase- Untereinheiten formieren einen hexameren Ring, der offenbar direkt mit dem heptameren Ring der  $\alpha$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms interagiert. Der „lid“- Subkomplex besteht aus nicht- ATPase- Untereinheiten, deren jeweilige Anzahl und Zusammensetzung speziesabhängig ist (bei höheren Eukaryonten: S3, p55, S9, S10, S12, S11, S14, S5b, S15, Poh1). Für diese Untereinheiten wurden starke Sequenzhomologien mit dem COP 9-Signalosom und dem eIF3 (eucaryotic translational initiation factor 3) aufgezeigt (Glickman 1998b).

Die ATPase- Untereinheiten fungieren ähnlich wie molekulare Chaperone. Sie können in ATP-abhängigen Zyklen nicht gefaltete Proteine und partiell gefaltete Intermediate stabilisieren und sie vor Aggregationen schützen. Des Weiteren agieren sie als qualitativer Selektionsmechanismus, um falsch gefaltete oder defekte Proteine (so genannte DRiPs) zu eliminieren. Es wurde postuliert, dass die ATPasen des 19S Komplexes bei der Entfaltung der Proteine mitwirken und somit den Zugang in das enzymatisch aktive Zentrum des 20S Proteasoms ermöglichen und kontrollieren können (Braun 1999).





**Abb. 5: Aufbau des 26S Proteasoms.** Im Zentrum dargestellt sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringe des 20S Kernkomplexes (vgl. Abb. 1). Die 19S Regulatoren bestehen aus 2 Subkomplexen, in orange die 9 nicht-ATPase-Untereinheiten des „lid“-Subkomplexes, der für die Substratbindung von Bedeutung ist. In violett abgebildet die AAA-ATPase-Untereinheiten, die mit weiteren nicht-ATPasen den „base“-Subkomplex formieren. Deutlich wird die Symmetrie des Komplexes (aus Klotzel 2001).

Wie oben beschrieben, ist der Zugang in den katalytischen Zylinder durch die N-terminalen Peptidsequenzen der  $\alpha$ -Untereinheiten verschlossen. Mehrere Autoren diskutieren, dass das Zentrum durch Interaktion mit den 19S Regulatoren, insbesondere mit den „base“-Subkomplexen für die Substrate zugänglich wird (Groll 1997, 2000, Glickman 1998a). Dafür spricht sowohl der unmittelbare Kontakt zwischen „base“ und  $\alpha$ -Ring, als auch die denkbare Energieabhängigkeit eines Öffnungsmechanismus, der durch ATP-Hydrolyse Rechnung getragen würde.

Ferner spielt der 19S Regulator eine wesentliche Rolle bei der Bindung von polyubiquitinierten Proteinen, wobei Ubiquitin als Degradationssignal in der Zelle fungiert. Für die AAA-ATPase-Untereinheit S5a wurde *in vitro* eine spezifische Affinität für Polyubiquitin nachgewiesen (Deveraux 1994), hingegen konnte S5a in späteren Arbeiten *in vivo* nicht als derartiger Rezeptor definiert werden (van Nocker 1996, Fu 1998). In *S. cerevisiae* ist Rpn 10 (Homolog zu S5a) für den Proteinabbau ubiquitinerter Substrate nicht essentiell (Rubin 1997). Somit muss also mindestens eine weitere Bindungsstelle für Ubiquitin innerhalb des 19S vorhanden sein. So führten zum Beispiel in weiteren Analysen Mutationen der „base“-Untereinheiten Rpn 2 (S1) und Rpn 1 (S2) zu einer Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen (Bochtler 1999).

Ergänzend sei erwähnt, dass innerhalb des 19S Regulators auch eine 37kDa Isopeptidase nachgewiesen wurde. Durch deren enzymatische Aktivität können Ubiquitinketten vom jeweiligen Substrat abgespalten und im Zytosol reutilisiert werden (Lam 1997).

### 1.1.5 Das Ubiquitin- Proteasom- System

Dem Proteasom wird generell der Abbau von bis zu 90% der zellulären Proteine zugeschrieben (Rock 1994). Durch kovalente Bindung von Ubiquitin an kurzlebige Proteine werden diese für den Ubiquitin-abhängigen Abbau durch das 26S Proteasom markiert, wobei einzelne Untereinheiten des 19S Regulators für die Substratbindung und

Deubiquitinierung verantwortlich gemacht werden. Dabei ist insbesondere die Beteiligung des Ubiquitin- Proteasom- Systems an der Antigenprozessierung MHC Klasse I- restringierter Epitope hervorzuheben, bei der neben den 26S Proteasomen sowohl 20S-11S, als auch 19S-20S-11S-Komplexe beteiligt sind. Primär wurde für das Ovalbuminepitop SIINFEKL gezeigt, dass einer spezifischen zytotoxischen T-Zellantwort eine Ubiquitinierung vorangeht (Michalek 1993, Grant 1995). Die Funktion des Proteasoms in der Generierung von MHC Klasse I- Peptiden könnte ein Ansatz für antivirale T- Zellvakzine sowie Tumorstimmungsimpfung sein (Pickart 2000).

Viren können direkt mit der Antigenprozessierungsmaschinerie interagieren. So initiiert beispielsweise das E6 Onkoprotein, das von mit humanen Papillomaviren 16 oder 18 infizierten Keratinozyten des Zervixepithels exprimiert wird, nach Bindung an den Tumorsuppressor p53 dessen Ubiquitin- abhängigen Abbau durch das 26S Proteasom. Dies führt zu einer verminderten intrazellulären Konzentration von p53 und beeinträchtigt somit den kontrollierten Zellzyklus (Coux 1996, Scheffner 1990).

Zum anderen ist das 26S Proteasom für die Degradation von falsch gefalteten Proteinen, von Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren und Onkogenen verantwortlich. Ubiquitin bindet während des Zellzyklus phasenabhängig an Cyclin B und initiiert dessen Degradation. Dadurch wird simultan Cdk1 (cyclin-dependent kinase) abgeschaltet. Maligne Transformationen von kolorektaler Mukosa werden hingegen mit  $\beta$ - Catenin assoziiert. Der Abbau dieses Proteins erfolgt ebenfalls nach vorgegangener Ubiquitinierung (Hochstrasser 1996, Herskho 1998). Für das Onkoprotein cJun wurde der Ubiquitin- abhängige Abbau durch das 26S Proteasom *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Treier 1994). Andere Beispiele Ubiquitin- abhängiger Proteine stellen Ionenkanäle wie der CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) und der Wachstumshormonrezeptor dar (Ciechanover 1998). Signaltransduktionskaskaden unterliegen komplexen Regulationsmechanismen. Das Proteasom ist für die Spaltung des p105-Vorläuferproteins des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und die folgende Freisetzung der aktiven p50- Untereinheit verantwortlich (Coux 1996). Unter Zuhilfenahme von Proteasomeninhibitoren wie MG132 konnte die beschriebene Aktivierung von NF $\kappa$ B durch das Proteasom in Restenosestudien verhindert werden. Der antiinflammatorische, antiproliferative und proapoptotische Effekt dieser Inhibitoren des Proteasoms reduziert die Neointimaformation von traumatisierten Gefäßwänden und impliziert einen therapeutischen Ansatz in der Prävention von vaskulären Restenosen nach Angioplastien (Meiners 2002).

Für viele Membranproteine stellt Ubiquitin wiederum ein Signal für die Endozytose und

Vakuolen- bzw. Lysosomenformation dar. In das ER (*Endoplasmatisches Retikulum*) eingeschleuste Proteine können nach retrogradem Transport in das Zytosol ubiquitiniert und zytosolisch abgebaut werden. Dies ist zum Beispiel für MHC Klasse I- Ketten der Fall, die nach Infektion von humanen Zellen mit dem Cytomegalievirus und konsekutiver Expression von US11-Genen als ein Mechanismus der Immunabwehr aus dem ER eliminiert werden (vgl. Tab. 2, Wiertz 1996).

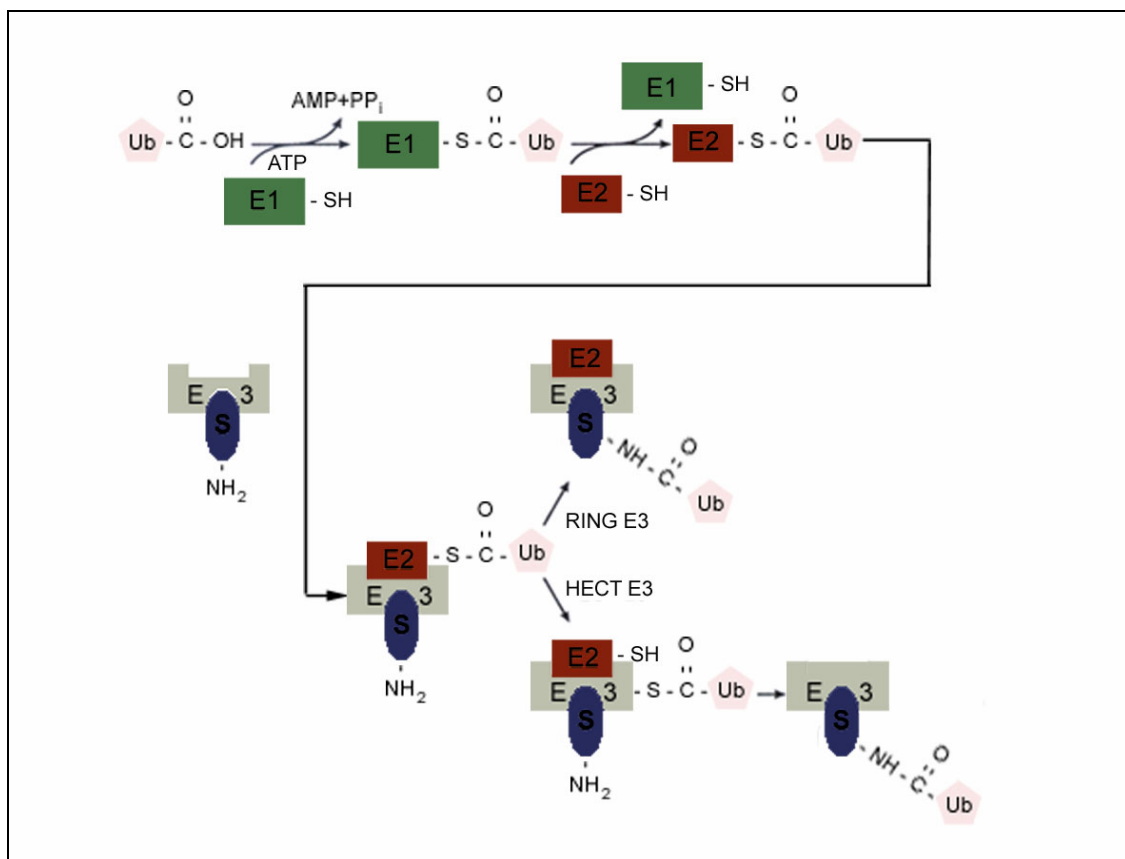
Trotz der ausführlich dargestellten Zusammenhänge zwischen Ubiquitin und dem 26S Proteasom stellt sich die Frage, ob sich die Funktion des Ubiquitins auf ein Erkennungssignal für den Proteasekomplex beschränkt. Einerseits wurde postuliert, dass es die Proteinentfaltung initiiert, andererseits wurde ein indirekter Einfluss auf die Denaturierung von Proteinen im Wechselspiel mit dem 19S Regulator diskutiert. So könnte Ubiquitin insofern unterstützend wirken, als dass es schwierig zu entfaltenden Proteinen einen längeren Kontakt zum 19S gewährt, bis die völlige Denaturierung den Abbau durch das 26S Proteasom gestattet (Hochstrasser 1996). Diese These korreliert auch mit den experimentellen Daten, nach denen chemisch denaturierte oder modifizierte Proteine ohne Ubiquitinierung vom Proteasom abgebaut werden können (Michalek 1996).

Gleichzeitig stellt sich die Frage, ob eine Ubiquitinierung in jedem Fall für den proteasomalen Abbau essentiell ist. So konnte für verschiedene Proteine wie den Cdk Inhibitor p21<sup>CIP21</sup> oder oxidiertes Calmodulin nachgewiesen werden, dass sie nicht der Ubiquitinierung bedürfen (Sheaff 2000, Ferrington 2001). Ein weiteres, detailliert charakterisiertes Beispiel ist die Ornithindecarboxylase, deren Abbau in Gegenwart von Antizym ohne Ubiquitinierung vom 26S Proteasom vollzogen und im Folgenden näher erläutert wird (Murakami 1992).

## 1.2 Die Ubiquitin Kaskade

Ubiquitin ist ein hoch konserviertes, globuläres Protein, das aus nur 76 Aminosäuren besteht. In der evolutionären Entwicklung zeigen sich zwischen Hefe- und humanem Ubiquitin lediglich 3 Aminosäureaustausche. Die Ubiquitinierung löslicher zytosolischer und nukleärer Proteine unterliegt einem komplexen Mechanismus, dem verschiedene Enzyme angehören. Initial wird das C- terminale Glycin (G76) des Ubiquitins ATP- abhängig zu einem hochenergetischen Thioesterintermediat aktiviert. Diese Reaktion wird durch E1 (ubiquitin activating enzyme) beschleunigt. Dem schließt sich der Transfer des Intermediates an E2 (ubiquitin conjugating enzyme oder ubiquitin carrier protein) an, wobei eine Vielzahl derartiger Enzyme charakterisiert werden konnten. E3 (ubiquitin protein ligase) katalysiert den finalen Schritt des Konjugationsprozesses, die kovalente Bindung von Ubiquitin an das Substrat. Ubiquitin, speziell G76, bildet mit der  $\epsilon$ - Aminogruppe ( $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>) eines Lysinrests des Proteinsubstrats eine Isopeptidbindung. Es existieren verschiedene ligierende E3 Enzyme. So sind HECT (*homologous to E6-associated protein carboxy terminus*) Domänen

beschrieben, deren C-Terminus eine Sequenzhomologie zum E6 Protein (Onkoprotein in HPV- infizierten Epithelzellen) aufweist. In diesem speziellen Fall wird Ubiquitin an ein Cystein in der HECT Region in Form eines Thioesters gebunden und darauf folgend an das Substrat transferiert. Eine Mutation in der 350 AS langen HECT Sequenz wurde bei Patienten mit ANGELMAN-Syndrom nachgewiesen. Eine andere Form von E3 Enzymen sind so genannte RING finger, die Metallionen wie  $Zn^{++}$  binden können. Diese spezifischen Enzymvarianten übertragen Ubiquitin direkt von den konjugierenden Enzymen auf die Substrate (Hershko 1998, Weissmann 2001).



**Abb. 6: Ubiquitinkaskade** → Freies Ubiquitin (Ub) wird ATP-abhängig aktiviert und formiert mit E1 (Ub-aktivierendes Enzym) eine Thiolesterbindung. Ub wird dann an E2 (Ub-konjugierendes Enzym) gebunden, welches mit E3 (Ub-Proteinligase) assoziiert. Bei RING E3-Enzymen wird Ub direkt von E2 an das Substrat transferiert, im Falle der HECT (*homologous to E6-AP carboxy terminus*) Domänen wird Ub zunächst an ein Cystein des E3-Komplexes gebunden, erst im Anschluss wird es an das Substrat übertragen (in Anlehnung an Weissmann 2001).

Die Bindung von Polyubiquitin an Substrate stimuliert die Proteolyse, obwohl *in vitro* in Retikulozytenlysaten auch Monoubiquitin den Proteinabbau suffizient initiierte (Shaeffer 1995). Allgemein gültig ist jedoch, dass zwischen Lysin 48 und Glycin 76 durch Isopeptidbindungen verknüpfte Polyubiquitinketten das entscheidende Abbausignal darstellen (Chau 1989). Mutanten dieser Lysinreste oder methyliertes Ubiquitin hingegen führen zu einem Kettenabbruch und inhibieren die Proteolyse (Ciechanover 1998).

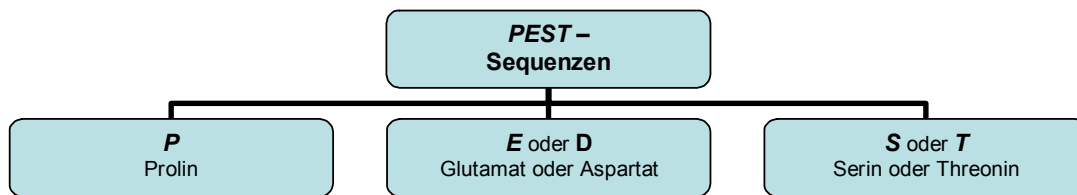
Ubiquitinreste sind für die Erkennung des Substrats durch das 26S notwendig, stellen jedoch nicht zwangsläufig ein Abbausignal dar. Mit acht Ubiquitinen markierte Proteine hingegen weisen eine hohe Affinität und zwangsläufig eine längere Verweildauer am Proteasom auf, deubiquitinierende Enzyme benötigen entsprechend mehr Zeit, um einzelne Ubiquitine abzuspalten (Thrower 2000). Die Hydrolyse der die Ubiquitine vernetzenden Isopeptidbindungen erfolgt einerseits durch die Isopeptidase des 19S Regulators. Andererseits wurden deubiquitinierende Enzyme wie Doa4, die nicht Bestandteil des 26S Komplexes sind, identifiziert (Ciechanover 1998).

### 1.3 ODC- Abbau durch das 26S Proteasom

Die Ornithindecaboxylase (ODC) besteht aus insgesamt 461 Aminosäuren und hat mit wenigen Minuten bis zu einer Stunde eine der kürzesten Halbwertszeiten aller Enzyme überhaupt. ODC katalysiert die Synthese von Diaminoputrescin aus Ornithin, einem Intermediat in der Polyaminsynthese und stellt als induzierbares Enzym den wichtigsten Regulationsfaktor dieses Zyklus dar. Diaminoputrescin wird über weitere Zwischenstufen zu Spermidin und Spermin umgebaut. Polyamine wie Spermin sind multivalente organische Kationen, deren Interaktion mit negativ geladenen Polyanionen wie RNA und DNA einen neutralisierenden Effekt und ergo eine Stabilisierung derselben zur Folge hat. Sie können andererseits die RNA- bzw. DNA- Biosynthese stimulieren, werden auch als Wachstumsfaktoren beschrieben. Die Ornithindecaboxylase unterliegt vielfältigen Regulationsmechanismen. So bewirkt die Zugabe von Somatotropin, Kortikosteroiden oder Testosteron zu Mammalierzellkulturen einen 10- bis 200-fachen Anstieg der ODC-Konzentration in der Zelle. Dies impliziert unter anderem das Potential der Ornithindecaboxylase, ein klinisch relevanter Angriffspunkt einer antimitotischen Chemotherapie zu sein.

Neben der Synthese ist aber auch der Abbau des Enzyms einer besonderen physiologischen Kontrolle unterlegen. So wurde ein Anti-Enzym für ODC, das Antizym, als notwendiges Protein für die Degradation identifiziert. Es handelt sich dabei um ein 227 Aminosäuren langes Protein, dessen C- terminale Reste spezifisch an die Aminosäuren 117-140 der ODC binden (vgl. Abb. 8). Antizym weist eine hohe Affinität zum inaktiven ODC- Monomer auf, bindet hingegen auch an das katalytisch aktive Homodimer der ODC. Im letzten Fall interagieren zwei Antizymmoleküle mit einem ODC- Homodimer und bilden inaktive Antizym-ODC- Heterodimere (Coffino 2001). Die Bindung an ODC bewirkt eine Konformationsänderung des Enzyms, welche das C- terminale Degradationssignal der ODC für das 26S Proteasom zugänglich macht. Dieses Abbausignal ist das für Aminosäure 423 bis 449 beschriebene PEST- Motiv (vgl. Abb. 7). PEST- Sequenzen sind hydrophile Sequenzabschnitte einer Proteinsequenz mit einer Länge von mindestens zwölf

Aminosäuren, wobei wenigstens ein Prolin (P), ein Glutamat (E) oder Aspartat sowie ein Serin (S) oder Threonin (T) in dieser Sequenz vorkommen. Diese Bereiche werden von Lysinen, Argininen und Histidinen flankiert.



**Abb. 7: PEST- Motive** sind hydrophile Sequenzabschnitte, die wenigstens 12 Aminosäuren lang sind und zudem mindestens ein Prolin ( P ), ein Glutamat oder Aspartat ( E oder D ) und ein Serin oder Threonin ( S oder T ) enthalten (Abb. beruht auf Daten aus Rechsteiner 1996).

Diese spezifischen Sequenzelemente werden als alternative Degradationssignale zum Ubiquitin diskutiert (Rechsteiner 1996, Jariel-Encontre 1995). Die Abspaltung des C-Terminus der murinen ODC an Position 424, also unmittelbar vor Beginn des PEST- Motivs, führte zum Beispiel zu einer Zunahme der Stabilität des Proteins um den Faktor zehn (Ghoda 1989). Demnach initiiert Antizym nach Bindung an ODC deren ATP- abhängige Sequestration an und in das 26S Proteasom, dadurch kommt es zu einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms. Der direkte Nachweis dafür wurde in Immunopräzipitationen erbracht.

Zusammenfassend kann durch ergänzende Studien mit Proteasomeninhibitoren wie MG132 postuliert werden, dass sowohl Energie in Form der Phosphoanhydridbindung des ATP als auch Antizym für die irreversible Inaktivierung der Ornithindecaboxylase durch das 26S Proteasom notwendig sind, die proteolytische Aktivität des 20S Komplexes hingegen für die Degradation des Enzyms unerlässlich ist. Antizym wird infolge der Bindung von ODC an das 26S Proteasom ähnlich dem Ubiquitin vom Substrat abgespalten und kann intrazellulär reutilisiert werden. Die somit inaktivierte ODC unterliegt im Weiteren dem prozessiven proteolytischen Abbau durch die katalytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten des 20S Core-Komplexes (Murakami 1992, 1999).



**Abb. 8: Das ODC- Protein** ist schematisch dargestellt (AS 1-461), farbig markiert sind funktionell relevante Abschnitte der Sequenz. Rot hervorgehoben ist der Bereich von Aminosäure 117 bis 140 mit positiver Oberflächenladung, der für die Antizymbindung verantwortlich ist. Grün und blau markiert sind PEST- Motive. Das PEST2- Motiv wurde als definitives proteolytisches Signal für den proteasomalen Abbau der Ornithindecaboxylase identifiziert (Murakami 2000, Rechsteiner 1996).

## 1.4 Antigenprozessierung durch das 26S Proteasom

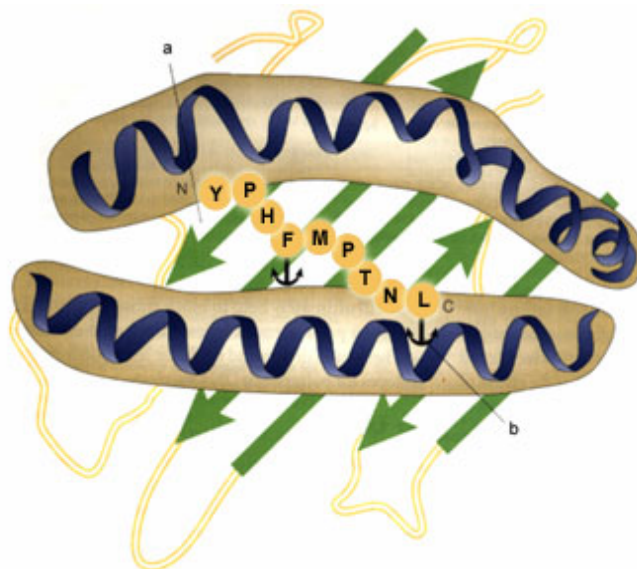
Die Fähigkeit des Immunsystems höherer Eukaryonten, fremde Proteine spezifisch zu erkennen und daraufhin entsprechend zu reagieren, bedarf im Allgemeinen der Aktivierung von T- Lymphozyten. Die Antigen- spezifischen Rezeptoren dieser T- Zellen können Fremdproteine hingegen nicht direkt erkennen, erfordern vielmehr die Bindung von Antigenen an bestimmte körpereigene Oberflächenmoleküle. Diese Moleküle werden von einer Gruppe verbundener Genabschnitte namens *major histocompatibility complex* (MHC) kodiert; für den humanen MHC wird synonym *humanes Leukozyten- Antigensystem* (HLA) gebraucht. Zwei Subklassen von T- Lymphozyten ( $CD4^+$  und  $CD8^+$ ) erkennen die Peptide im Zusammenhang mit der Bindung an strukturell verwandte MHC- Moleküle, MHC Klasse II und MHC Klasse I. Die an diese beiden Klassen von MHC- Molekülen gebundenen Peptide entstammen zwei verschiedenen intrazellulären proteolytischen Systemen, dem Klasse I oder endogenem und dem Klasse II oder exogenem Weg.

### 1.4.1 Der MHC Klasse I- Weg der Antigenprozessierung

Antigene Peptide mit hoher Affinität gegenüber MHC Klasse I- Molekülen entstammen überwiegend aus dem zellulären Proteinumsatz, wobei etwa 40% aller neu synthetisierten Proteine unmittelbar nach der Translation degradiert werden. Diese nicht funktionellen Proteine, auch als DRiPs (*defective ribosomal products*) bezeichnet, werden teilweise ubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut. Sie dürften demnach die entscheidende Quelle von MHC Klasse I- Peptiden sein (Schubert 2000, Turner 2000). Die vom Proteasom generierten antigenen Peptide werden ATP- abhängig mittels TAP (*transporter associated with antigen processing*) aus dem Zytosol in das ER (*Endoplasmatisches Retikulum*) transferiert. TAPs gehören der ABC-Familie von ATP- abhängigen Transporterproteinen an, sie sind Heterodimere, die aus TAP.1- sowie TAP.2- UE bestehen. In der Regel transferieren sie Peptide mit einer Länge von 7 bis 15 Aminosäuren, wobei humane TAPs Peptide mit hydrophoben oder basischen C- terminalen Resten präferieren. MHC Klasse I- Epitope weisen in der überwiegenden Zahl der Fälle eine Länge von 9 Aminosäuren auf, woraus einerseits auf ein zusätzliches Schneiden von Vorläuferpeptiden innerhalb des ER, das so genannte ER- trimming, als auch auf eine Retranslokation einiger Peptidfragmente in das Zytosol geschlossen werden kann (Rock&Goldberg 1999, Pamer&Cresswell 1998). Es wurden inzwischen zahlreiche Aminopeptidasen charakterisiert, die für die Hydrolyse N- terminal elongierter Peptidepitope verantwortlich gemacht werden konnten. Erwähnt seien die IFN $\gamma$ - induzierbare ERAP 1 (ER Aminopeptidase 1), die Thimet Oligopeptidase sowohl die Puromycin- sensitive Aminopeptidase und die Bleomycin- Hydrolase (Beninga 1998, Koetzel 2001, Stoltze 2000).

Die Expression von Peptidtransportern (TAP) ist unmittelbar mit der Synthese von MHC

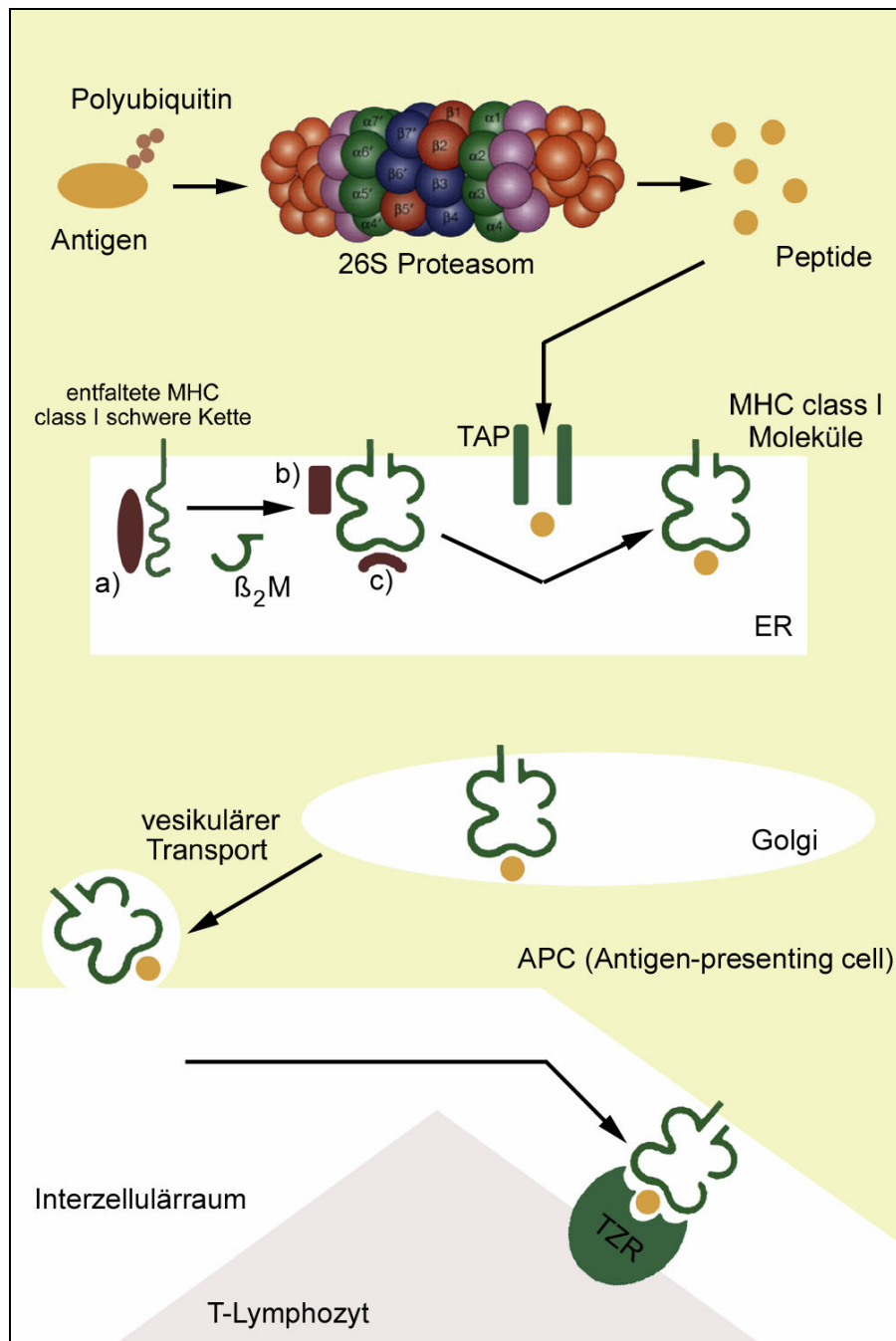
Klasse I- Molekülen verknüpft, ihre Genloci befinden sich in enger Nachbarschaft auf dem humanen Chromosom 6. Die Synthese beider Proteinkomplexe ist durch das pleiotrope Zytokin IFN $\gamma$  induzierbar. Die humane MHC Klasse I- Region enthält drei Genloci, HLA-A, HLA-B, HLA-C, bei der Maus wird zwischen H-2K, H-2D und H-2L unterschieden. MHC Klasse I- Moleküle setzen sich strukturell aus einer glykosylierten schweren Kette (Domänen:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$ ) und dem nicht- kovalent assoziierten  $\beta_2$ -Mikroglobulin zusammen. Die extrazellulären Domänen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  weisen in ihrer Struktur eine lange Furche auf, die als spezifische Peptidbindungstasche identifiziert werden konnte. Sie stellt das Charakteristikum der einzelnen MHC- Haplotypen dar, die sich hauptsächlich durch einzelne Aminosäureaustausche innerhalb der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ - Domänen unterscheiden. Daraus resultieren dramatische Unterschiede in der Struktur der Peptidbindungstasche. Die polymorphen MHC- Moleküle weisen verschiedene Präferenzen für Aminosäurereste in spezifischen Positionen, so genannte Ankerreste auf (vgl. Abb. 9; Madden 1995).



**Abb. 9: MHC Klasse I- Peptidbindungstasche (a)**, in grün sind die antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter, in blau die  $\alpha$ -Helices dargestellt. In die somit formierte Furche ist in diesem Fall das pp89 Epitop YPHFMPNTL (vgl. Abb. 12) mit dem spezifischen C-terminalen Ankerrest Leucin (b) gebunden (aus Klotzel 2001).

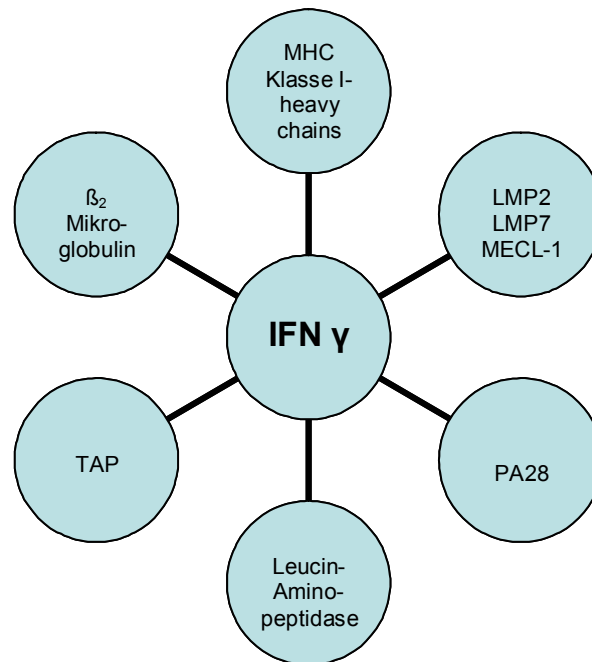
Die Assemblierung der schweren Ketten und MHC- Dimere (bestehend aus schwerer Kette und  $\beta_2$ M) wird durch Chaperone wie Calnexin, Calretikulin und BiP unterstützt. Nach Peptidbindung an die MHC- Heterodimere wird dieser stabilisierte Komplex über den Golgi Apparat an die Zelloberfläche transportiert und von spezifischen T- Zellrezeptoren (TZR) CD8 $^+$  zytotoxischer Lymphozyten erkannt (vgl. Abb. 10). Die Interaktion zwischen TZR, CD3 und CD8 mit dem peptidbeladenen MHC- Komplex sowie von kostimulatorischen Proteinen wie CD28 mit dem B7-1-Ligand bewirkt die Aktivierung und Proliferation von Antigen-spezifischen T- Lymphozyten, die wiederum lytisch und toxisch auf Antigen- präsentierende Zellen wirken (Klotzel 2001, Rock & Goldberg 1999, Yewdell 1999).





**Abb. 10: MHC Klasse I Assemblierung und Antigenpräsentation.** Substrate, die MHC Klasse I - Epitope enthalten, werden an Polyubiquitin gebunden und somit vom 26S Proteasom erkannt und degradiert. Die generierten Peptide mit einer Länge von 7 bis 15 Aminosäuren werden über TAP (transporter associated with antigen processing) in das ER überführt. MHC Klasse I schwere Ketten werden kotranslational in das ER inseriert, dort wird die Assemblierung der MHC- Moleküle durch molekulare Chaperone wie a) Calretikulin, b) ERp57 und c) BiP koordiniert. Die MHC Klasse I- Heterodimere, bestehend aus der gefalteten schweren Kette und  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2$ M), werden durch die Peptidbeladung stabilisiert und im Anschluss als Komplex via vesikulären Transport über den Golgi Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Spezifische Haplotypen kodieren einzelne MHC- Moleküle, die wiederum charakteristische Peptide binden. Die peptidbeladenen MHC- Komplexe werden von spezifischen T-Zellrezeptoren der  $CD8^+$  zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt, stimulieren deren Proliferation und initiieren somit die Zerstörung der infizierten Zielzellen. Antigen- präsentierende Zellen sind vor allem dendritische Zellen, Makrophagen und Monozyten (Abb. in Anlehnung an Kloetzel 2001).

An mehreren Stellen wurde bereits der immunregulatorische Effekt von IFN $\gamma$  unterstrichen, der in Abb. 11 nochmals zusammenfassend aufgezeigt wird.



**Abb. 11: Zusammenfassende Darstellung des pleiotropen Zytokins Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ).**

Das Protein wird vorwiegend von lymphatischen Zellen exprimiert und zeigt vielfältige regulierende Effekte auf die zelluläre Immunantwort. Einerseits übt es einen direkten Effekt auf die Replikation von Pathogenen aus, andererseits kann es die Immunantwort insofern beeinflussen, als dass die Replikation von Pathogenen indirekt limitiert wird. So stimuliert es die Synthese von TAP,  $\beta_2$ -Mikroglobulin, MHC Klasse I schweren Ketten, der Immununtereinheiten des Proteasoms und dessen Regulator PA28. Zytosolische Exopeptidasen wie Leucin-Amino-peptidase (ERAP1) unterliegen ebenfalls der Induktion durch IFN $\gamma$  (Daten aus Geginat 1997, Beninga 1998).

#### **1.4.2 Das Cytomegalievirus - Prozessierung eines spezifischen viralen Epitops**

Das Proteasom spielt, wie oben beschrieben, die entscheidende Rolle in der Generierung antigenen Peptide. Im Folgenden sei nun ein spezielles Augenmerk auf ein sehr detailliert studiertes Protein des murinen Cytomegalievirus geworfen, dessen Abbaumechanismus durch das Proteasom jedoch nicht vollständig aufgeklärt ist.

##### **1.4.2.1 Das humane Cytomegalievirus**

Das Cytomegalievirus (CMV) ist ein doppelstrangiges DNA-Virus, das durch ein enges Wirtsspektrum und eine langsame Vermehrung gekennzeichnet ist. Pathophysiologisch charakteristisch ist in der Regel eine inapparente Erstinfektion. Bis zum mittleren Erwachsenenalter sind bis zu 90% der Population mit dem Virus infiziert. Eine Reaktivierung dieser latenten Infektion kann zu mononukleoseartigen Krankheitsbildern, milden Hepatitiden und fieberhaften Allgemeinsymptomen führen. In der Gruppe Immunsupprimierter wie AIDS-, Transplantations- oder Malignompatienten hingegen manifestiert sich die CMV-Infektion als ein schweres generalisiertes Krankheitsbild in Form einer CID (cytomegalic inclusion disease) mit potentiell letalem Ausgang. Neben der Hepatotoxizität dominieren Retinitiden

bei AIDS-Patienten, CMV- Pneumonien sowie ein Befall der Mesangialzellen bei Nierentransplantierten.

Wie auch für weitere Herpesviren gezeigt wurde (Fruh 1995, Hill 1995), weist das Cytomegalievirus zahlreiche Mechanismen zur Umgehung einer adäquaten Immunantwort des Wirts auf. Während der Latenzphase ist die Transkription viraler Proteine deutlich reduziert. Weiterhin kommt es zur Modulation spezifischer Immunfunktionen. Das hCMV (*humanes Cytomegalievirus*) kodiert 4 Gene, deren funktionelle Proteine mit dem MHC Klasse I- Weg der Antigenpräsentation interagieren (Rensch 1999). Das US3 Gen (gp23 Protein) wird während der Infektion sehr früh exprimiert. Dieses Glykoprotein bindet an MHC Klasse I- Moleküle und führt zu deren Retention und Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum (ER) der infizierten Zellen (Jones 1996). Das Glykoprotein 21 (gp21, US6 Gen) wiederum stellt ein Transmembranprotein dar, das durch Interaktion mit TAP an der luminalen Seite im ER dessen Transportfunktion inhibiert und somit die Antigenpräsentation reduziert (Lehner 1997). Glykoproteine 24 und 33 sind Produkte späterer Phasen der Infektion. Diese Proteine bewirken den retrograden Transport neu synthetisierter MHC- Moleküle aus dem ER in das Zytoplasma und damit einen rapiden Abbau dieser körpereigenen Proteine durch das Proteasom (Wiertz 1996). Insgesamt führen diese variablen Mechanismen zu einer dramatisch reduzierten Präsentation von viralen Peptiden gegenüber spezifischen zytotoxischen T- Zellen.

hCMV Gen	Glykoprotein	Effekt auf Immunantwort
US6	gp21	Transmembranprotein inhibiert den Peptidtransport via TAP
US3	gp23	Glykoprotein bindet an MHC Klasse I- Moleküle, dadurch Retention und Akkumulation im ER der Zellen
US2 US11	gp24 gp33	Degradation von MHC Klasse I- Molekülen durch retrograden Transport derselben in das Zytoplasma

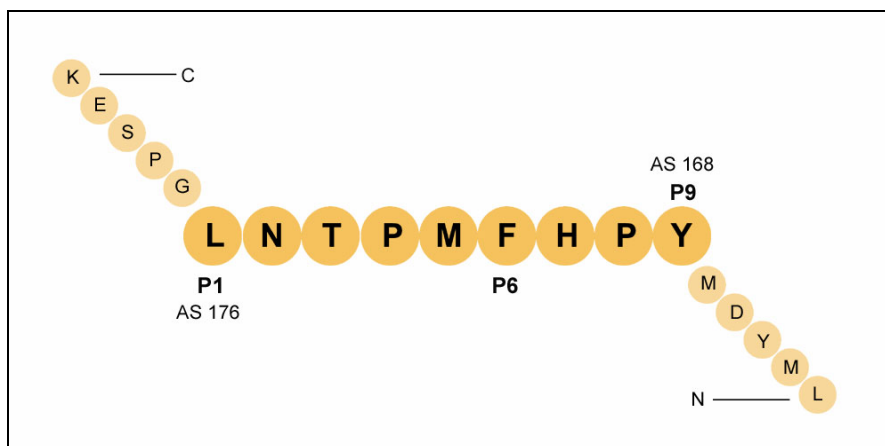
**Tab. 2:** Zusammenfassende Darstellung der einzelnen Effekte von hCMV- Proteinen auf die Umgehung der zellulären Immunantwort. Informationen aus Jones 1996, Lehner 1997, Wiertz 1996.

#### 1.4.2.2 Das murine Cytomegalievirus und pp89

Detaillierte Daten hinsichtlich des Proteinabbaus durch das Proteasom und damit der Antigenprozessierung liegen hingegen hauptsächlich für das murine Cytomegalievirus (mCMV) vor. Nach Infektion von Fibroblasten mit mCMV führt die Expression von sehr frühen Genen zur Präsentation eines Peptids auf einem MHC Klasse I H-2L<sup>d</sup> Molekül. Dieses antigene Peptid stammt vom mCMV IE pp89 (*immediate early phosphoprotein 89kDa*) und wurde als das Nonapeptid **YPHFMPNTL** charakterisiert (vgl. Abb. 9, 12; Reddehase 1989,

del Val 1991). Eine *de novo* Synthese des pp89 ist Voraussetzung für die proteasomale Degradation des Proteins und somit die Generierung dieses spezifischen Epitops (Geginat 1997).

Das Epitop beinhaltet mit dem Prolin an Position 8 (P8: P) und dem Leucin an Position 1 (P1: L) für das H-2L<sup>d</sup>- Molekül spezifische Ankeramino-säuren, die für die MHC- Bindung des Peptids in die Bindungstasche des MHC Klasse I- Moleküls von Bedeutung sind. Proline innerhalb eines viralen Epitops fördern die Präsentation desselben, sie werden für einen verminderten proteasomalen Abbau der Epitope und der daraus folgenden Stabilisierung verantwortlich gemacht (Shimbara 1998).



**Abb. 12: mCMV pp89:** murines Cytomegalievirus immediate early phosphoprotein 89kDa. Das pp89- Epitop (P1-P9) wird auf H-2L<sup>d</sup> (murinen MHC Klasse I)- Molekülen präsentiert, dort in der Bindungstasche über spezifische Aminosäurereste (P1 und P8) sowie Wasserstoffbrückenbindungen verankert.

Das an Position 6 (P6) befindliche Phenylalanin hingegen ist für den Kontakt zum peptid-spezifischen T- Zellrezeptor der CD8<sup>+</sup> T- Lymphozyten von Relevanz. In Mutationsanalysen wurden die Aminosäuren Y<sub>1</sub> und L<sub>9</sub> gegen A (Alanin) ausgetauscht, wodurch die antigene Potenz des viralen Epitops (APHFMPTNA) verloren ging. Dies ist insbesondere auf die durch den Aminosäureaustausch hervorgerufene Konformationsänderung des Peptids zu erklären (Reddehase 1991, Rock & Goldberg 1999, Knuehl 2001).

Das Proteasom als Proteasekomplex spielt, wie bereits mehrfach erwähnt, eine entscheidende Rolle in der Prozessierung von MHC Klasse I- Liganden (Rock 1994, Chiechanover 1998). Um einen näheren Einblick in die Antigenprozessierung zu erhalten, wurden verschiedene epitopflankierende Polypeptide synthetisiert und deren Abbau durch Proteasomen untersucht. Auf diesem Wege konnte gezeigt werden, dass 20S Proteasomen *in vitro* aus 25-40mer Peptiden spezifische Epitope prozessieren. Dieses Resultat wurde durch mehrere experimentelle Ansätze in seiner Gültigkeit bekräftigt, in denen Polypeptide durch Minigene in Mauszellen transfiziert wurden. Die peptidspezifische zytotoxische T- Zellantwort dieser Zellen war der mit spezifischen Peptidsequenzen (durch 20S *in vitro* generierte Epitope) von extern beladenen Zellen annähernd identisch (Eggers 1995). In

diesem Zusammenhang konnte unter anderem demonstriert werden, dass 20S Proteasomen in *in vitro* Verdau die proteolytische Aktivität besitzen, aus einem synthetischen epitoptragenden 25mer pp89-Peptid das entsprechende 9mer, das korrekte H-2L<sup>d</sup> restringierte Epitop **YPHFMPNTL** mit hoher Präzision zu generieren (Boes 1994, Dick 1996).

IFN $\gamma$  stimuliert im Rahmen der Immunantwort, wie in Abb. 11 dargestellt, einerseits die Synthese von PA28, andererseits die Umwandlung von konstitutiven 20S Proteasomen in Immunoproteasomen. Das pp89-Epitop wird in Anwesenheit von PA28 beschleunigt vom Proteasom generiert, jedoch ändert sich das Verhältnis der verschiedenen Abbauprodukte unter diesen Bedingungen nicht wesentlich (Dick 1996, Groettrup 1996). In Anwesenheit von Proteasomeninhibitoren hingegen wurde eine verminderte Präsentation von pp89-Epitopen auf MHC Klasse I- Molekülen auf der Zelloberfläche infizierter Zellen beobachtet.

In verschiedenen Experimenten wurde gezeigt, dass einige der MHC- Liganden präzise vom Proteasom generiert werden, also keiner zusätzlichen enzymatischen Peptidabspaltung bedürfen (Lucchiari-Hartz 2000, Niedermann 1999). Allerdings demonstrieren Analysen des Transports von Peptiden in das ER, dass zum Beispiel das immunodominante Epitop des mCMV pp89 lediglich in Form eines N- terminal elongierten 11mers vom TAP ins ER transportiert wird. Die epitoptragenden 11mere werden demnach ebenfalls vom Proteasom generiert. Ursache für den nicht erfolgenden Transport des 9mer Epitops ins ER ist anscheinend das Prolin an Position 2 (Knuehl 2001, Neisig 1995, Neefjes 1995, van Endert 1995). Die Identifizierung einer IFN $\gamma$ - abhängigen Peptidase, der Leucin- Amino-peptidase (Synonym ERAP1) unterstützt diese Vermutung (vgl. Abb. 11). Dieses Bestatin- empfindliche Enzym ist für die N- terminale Hydrolyse von Aminosäuren im ER verantwortlich, unter IFN $\gamma$ - Zusatz zu Zellen kann eine beschleunigte Prozessierung von 8mer- aus 11mer-Peptiden beobachtet werden (Beninga 1998).

Des Weiteren zeigten Analysen der Generierung des Ovalbuminepitops SIINFEKL, dass hauptsächlich N- terminal verlängerte Varianten als Precursor dieses 8mers nach proteasomalem Verdau entstehen. Das Proteasom ist damit für den Schnitt am C- Terminus verantwortlich. Somit wird die entsprechende AS des spezifischen MHC Klasse I- Haplotyps, die als Ankerrest bezeichnet wird, vom Proteasom am C-Terminus generiert. Die proteasomale Funktion beruht vielmehr auf einem schnellen Abbau von Proteinen zu Aminosäuren als in einer genauen Generierung von spezifischen MHC Klasse I- Liganden. Diese werden vom Proteasom als 10-12mer Peptide generiert und überwiegend durch im ER lokalisierte Amino- Exopeptidasen hydrolysiert (Cascio 2001, Lauvau 1999).

Ähnlich wie oben für das hCMV beschrieben, konnte anhand des spezifischen pp89-Epitops auch für das mCMV gezeigt werden, dass es im Rahmen einer Infektion zu einer Hemmung der Immunantwort kommt. So führt die Synthese von frühen Genen des mCMV (in chronologischer Folge zu sehr frühen Genen wie pp89) auf der Zelloberfläche zu einer verringerten Präsentation des vom pp89 generierten 9mers (del Val 1989). Für mit mCMV infizierte murine Fibroblasten wurde eine Reduktion von MHC Klasse I- Molekülen auf der Zelloberfläche nachgewiesen (Reusch 1999, del Val 1992). Gene, die in der frühen Phase der Infektion exprimiert werden, rufen eine Destabilisierung von reifenden MHC Klasse I- Molekülen hervor, was wiederum die Antigenpräsentation gegenüber CD8<sup>+</sup> T- Lymphozyten beeinträchtigt. TAPs werden in ihrer Fähigkeit, Peptide vom Zytosol ins ER zu translozieren, massiv gehemmt (Hengel 1996). Der Transport der peptidbeladenen MHC- Moleküle zur Zelloberfläche wird bereits zwischen ER und cis- Golgi- Kompartiment inhibiert. Demzufolge kommt es zu einer Retention von MHC Klasse I- Komplexen und einer verminderten Oberflächenpräsentation der Antigene (del Val 1992).

Ein weiterer Mechanismus des „viralen Escape“ ist durch die Charakterisierung des murinen Glykoproteins gp48 (m06 Gen) aufgezeigt worden. Dieses Protein bildet einen festen Komplex mit dem peptidbeladenen MHC Klasse I- Molekül und bewirkt einen raschen lysosomalen Abbau des MHC Klasse I/gp48- Komplexes. gp48 inhibiert auch die Antigenpräsentation gegenüber pp89-spezifischen, H-2L<sup>d</sup>-restringierten zytotoxischen T- Lymphozyten (Rensch 1999).

### 1.5 Zielsetzung

Im Rahmen der zellulären Immunabwehr präsentieren körpereigene Zellen intrazelluläre Pathogene, die an spezifische MHC Klasse I- Moleküle binden und auf der Zelloberfläche der Erkennung durch spezifische zytotoxische T-Lymphozyten zugänglich werden. Diese intrazellulären Pathogene sind endogenen Ursprungs. Von besonderer Bedeutung für den Organismus sind virale Proteine, die im Allgemeinen Syntheseprodukte infizierter Zellen sind. Deren Prozessierung zum antigenen Peptid, d.h. dem spezifischen Epitop, wird in starkem Maße einer ATP-abhängigen Protease, dem Proteasom zugeschrieben, dessen Inhibition zu einer Blockade der MHC- Assemblierung infolge reduzierter Peptidgeneration führt (Rock 1994). Die optimale Antigenprozessierung bedarf vielfältiger regulatorischer Ereignisse wie der Assemblierung von Immunoproteasomen oder dem Einfluss von PA28- und 19S-Komplexen.

Ein vom mCMV abstammendes, durch das Proteasom generiertes antigenes, virales Peptid ist das 9mer Epitop YPHFMPTNL des pp89. Seine Präsentation auf der Zelle wird unter Einfluss von PA28 verstärkt, jedoch bewirken Immunoproteasomen und PA28 keine drastische Änderung der Peptidqualität bzw. des Verhältnisses der generierten Peptide (Dick

1996, Groettrup 1996). Allerdings wurden für die *in vitro* Untersuchungen artifizielle Substrate in Form synthetisierter Peptide (z.B. 25mer) gewählt, der Abbau des Proteins als physiologisches Substrat hingegen ist bislang nicht detailliert analysiert worden. Ziel dieser Arbeit war es, den Abbau des rekombinanten Proteins durch das Proteasom in seiner Kinetik zu verfolgen. Für die Untersuchung dieser Fragestellung sollte geklärt werden, ob das 20S/26S Proteasom dieses virale Protein *in vitro* ohne Zugabe von Ubiquitin verdauen kann und ob das antigene Peptid tatsächlich prozessiert wird? Des Weiteren sollte der Einfluss des proteasomalen Aktivators PA28 und der Immununtereinheiten auf diesen Prozess hinterfragt werden.

Die Zugabe von Proteasomeninhibitoren zu Zellkulturen resultierte in einer verringerten Präsentation des H-2L<sup>d</sup>- restringierten Epitops. Dies führt unter anderem zur Akkumulation von ubiquitinierten Substraten. Ubiquitin stellt ein konserviertes Abbausignal von Proteinen dar, seine Bindung an den 19S Regulator des 26S Proteasoms initiiert die Degradation des Substrats. Bisher konnte jedoch kein Nachweis erbracht werden, dass der Abbau von pp89 *in vivo* Ubiquitin- abhängig abläuft. Dementsprechend sollte der zelluläre Abbau des Proteins in Zellen, die stabil mit pp89 transfiziert wurden, analysiert werden. Dabei sollte insbesondere die Rolle von Ubiquitin im proteasomalen Substratabbau des pp89 untersucht werden und der Nachweis potentiell vorliegender Ubiquitin-Protein-Konjugate erbracht werden.

Die Möglichkeit eines zum Ubiquitin alternativen Degradationsignals konnte unter anderem für den Antizym- abhängigen Abbau der Ornithindecaboxylase nachgewiesen werden (Murakami 1992). In der Sequenz der ODC sind so genannte PEST- Motive enthalten, die als alternative Abbausignale diskutiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb alternativ auch ein ODCpp89- Fusionsprotein exprimiert und dessen ATP-abhängiger Abbau durch das 26S Proteasom besonders bezüglich der Generierung des 9mer Epitops untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Agarosegelkammer Geltray	Renner
Beta-Counter	Wallace
Elektrophorese Einheit Mighty Small II SE250/SE260	Hoefer
ElisaReader MR5000	Dynatech
Fluorimeter Fluostar Reader mit Easy Software	SLT / Tecan
French® Pressure Cell Press	SLM-Aminco
FPLC Äkta	Amersham Pharmacia
GammaCounter, Einkanalmessgerät Cobra	Canberra-Packard
HPLC System Gold	Beckman-Coulter
HPLC-Säule: Micra NPS ODS-I 1,5 µm Säule, PC (33x4,6 mm)	Bischoff chromatography
Kühlzentrifuge 54178	Eppendorf
Kühlzentrifuge Avanti J-25, Rotor GA/18 und SW40	Beckman-Coulter
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman-Coulter
Kühlzentrifuge RC24, Rotor SS34	Sorvall
Massenspektrometer, TSQ7000	Finnigan Mat
Minigel-System	Biorad
PCR Maschine UNO Block	Biometra
Phastsystem®	Pharmacia
Photometer UV-2102 PC Software UV-X101 PC	Shimadzu
Pipettus-Akku	Hirschmann
Phosphorimager FLA 3000	Fuji
S&S Biotrap® Elektroelutionskammer	Schleicher und Schnell
Semidry-Blot-Kammer	pEQLAB
Steril gard Hood classII A1 B3	Baker
Stickstofftank	Taylor-Wharton
Ultrafiltrationszelle	Amicon
Ultrazentrifuge L-70, Rotor SW40	Beckman-Coulter
UV-Tisch	Appligen
Zellkultur-Inkubator BB4220CV	Heraeus

#### 2.1.2 Reagenzien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien

3MM Papier	Whatman
AAF-CMK (Ala-Ala-Phe-Carboxymethylketon)	Sigma
Acrylamid 30 %, 29:1	Roth
Ampicillin	Applichem
Amylose-Resin	Biolabs
Aprotinin	Applichem
Bacto-Agar	DIFCO
Bacto-Trypton	DIFCO
Bestatin	Sigma
Beta- Mercaptoethanol	Serva
BSA, Fraktion V	Serva
Centricon® Plus-50	Millipore
Chromium Nuklid <sup>51</sup> Cr	NEN
DEAE Sephacel	Pharmacia
DMSO	Fluka
DTT	Roth
Epoxomicin	Alexis
FCS	Biochrom
fluorogene Peptid-Substrate	Bachem Biochemica
G418-Sulfat	GibcoBRL
Hefe-Extrakt	Difco
Hemin	Sigma
HPLC-Acetonitril	Baker
HPLC-Wasser	Baker
Hygromycin B	Roche
Interleukin-2, rekombinant, murin	Roche



IPTG	Roth
Kryoröhrchen	Nunc
Leupeptin	Applchem
L-Glutamin	Biochrom
Magermilchpulver	Difco
Met- freies RMPI-Medium	Seromed
MG132	Calbiochem
Mikrotiterplatten	Dynatec
Molekulargewichtsstandard, DNA	GibcoBRL
Molekulargewichtsstandard, Protein Rainbow	Amersham
Molekulargewichtsstandard, Protein prestained (blue)	Biolabs
MonoQ-Säule	Pharmacia
N- Ethylmaleinamid	Sigma
Nickel- NTA- Agarose	Qiagen
Nitrocellulose, BA-S85, verstärkt	Schleicher und Schnell
Oligonucleotide	BioTeZ Berlin Buch
Paraformaldehyd	Merck
PhastGel 4-15, native Pufferstreifen	Amersham Pharmacia
Penicillin/Streptomycin	Seromed
PepstatinA	Sigma
PMSF	Sigma
Proteinaseinhibitor- Cocktail Complete®	Roche
Protein A Sepharose CL-4B	Pharmacia Biotech
Protein G Agarose	Boehringer Mannheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
M-MuLV Reverse Transkriptase	Promega
Röntgenfilme: Xomat-UV/AR/Biomax-MR	Kodak
Schwefel Nuklid Tran <sup>35</sup> S Label <sup>TM</sup>	ICN
Seakem LE Agarose	FMC bioproducts
Shrimp alkalische Phosphatase	Roche
Sterilfilter 4.5, 0.2 µm	Schleicher und Schnell
T4 DNA Ligase	Roche
TEMED	Serva
Trifluoressigsäure	Fluka
Trypsin-EDTA	Gibco BRL
Tween 20	Serva
Zellkultur-Medien	Biochrom
Zellkultur-Plastikwaren, steril	Falcon, Greiner

### 2.1.3 Kits

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
GFX <sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
TA cloning Kit	Invitrogen
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
LigaFast <sup>TM</sup> Rapid DNA Ligation System	Promega

### 2.1.4 Oligonucleotide / Primer

PCR- Fragment	Sequenz (Restriktionsenzymchnittstellen kursiv)
pp89 1452 bp (5')	atg <i>gat cca tga taa aac aga act atc</i> (Bam HI)
pp89 1452 bp (3')	cgc <i>gaa ttc cac ttc ttg ctc ttc ttc</i> (Eco RI)
ODC_1; 1381 bp (5')	cgc <i>gga tcc atg agc agc ttt act aag ga</i> (Bam HI)
ODC_1; 1381 bp (3')	cgg <i>ggt acc cac att gat cct agc aga ag</i> (Kpn I)
pp89_1; 630 bp (5')	cgg <i>ggt acc atg ata aaa cag aac tat ca</i> (Kpn I)
pp89_1; 630 bp (3')	ccg <i>gaa ttc tca caa ggt tct gcc tct ggc ca</i> (Eco RI)
ODC_2; 1381 bp (5')	ccg <i>gaa ttc atg agc agc ttt act aag ga</i> (Eco RI)
ODC_2; 1381 bp (3')	ttt tcc ttt <i>tgc ggc cgc</i> cac att gat cct agc aga ag (Not I)
pp89_2; 630 bp (5')	cgc <i>gga tcc atg ata aaa cag aac tat ca</i> (Bam HI)
pp89_2; 630 bp (3')	ccg <i>gaa ttc caa ggt tct gcc tct ggc ca</i> (Eco RI)

### 2.1.5 cDNA-Konstrukte

Plasmidname	hergestellt von
pSTP19_pp89 murin	U. Kuckelkorn
pCRII_pp89 (1452bp) murin	A. Voigt
PRSETA_pp89 (1452bp) murin	A. Voigt
pCR2.1_pp89 (630bp) murin	A. Voigt
pET15b_ODC (1381bp) murin	Y. Murakami
pET_AZ murin	Y. Murakami
PRSETA_ODC/pp89 murin	A. Voigt
pIND/Hygro_pp89 long murin	A. Voigt
p[CMV]_HA Ubi	Treier 1994
p[CMV]_His Ubi	Treier 1994

### 2.1.6 Antikörper

Symbol	Quelle des Antikörpers
$\alpha$ pp89 b5/1, b5/12 (1:1000, Western blot)	del Val 1988
$\alpha$ pp89 b5/4 (1:1000, Western blot, Immunopräzipitation)	del Val 1988
$\alpha$ (RGS) <sub>4</sub> -His (1:1000, Western blot)	Qiagen
$\alpha$ PENTA-His (Immunopräzipitation)	Qiagen
$\alpha$ Ubiquitin (1:1000, Western blot)	DAKO
$\alpha$ HA (1:1000, Western blot, Immunopräzipitation)	Boehringer Mannheim
$\alpha$ MauslgG Peroxidase-konjugiert (1:10000, Western blot)	Dianova
$\alpha$ KaninchenIgG Peroxidase-konjugiert (1:10000, Western blot)	Dianova
$\alpha$ p53 Ab-5 (monoklonal, Immunopräzipitation)	Oncogene

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Amplifikation von DNA durch PCR

##### Material:

PCR-Maschine UNO Block (Biometra), Oligonukleotide (BioTeZ Berlin-Buch GmbH)

##### PCR-Ansatz (50 $\mu$ l):

- 1 $\mu$ l DNA (10ng/ $\mu$ l)
- je 1 $\mu$ l Oligonukleotid (100pmol/ $\mu$ l)
- 5 $\mu$ l 10 x PCR-Puffer + MgCl<sub>2</sub>
- 2.5 $\mu$ l dNTP (2.5mM)
- 8 $\mu$ l Betain (10mM)
- 0.5 $\mu$ l Taq-Polymerase

Ansatz in 0.5ml Eppendorf- Tubes, mit 50 $\mu$ l Mineralöl überschichtet

PCR-Bedingungen: Denaturierung der DNA und der Oligonukleotide für 5min bei 95°C, 30 Zyklen: 1min 95°C; 1min 60°C; 1.5min 72°C; im Anschluss 10min 72°C.

#### 2.2.1.2 Amplifikation von RNA durch RT-PCR

Im ersten Schritt wird die isolierte RNA mittels der reversen Transkription von mRNA in cDNA umgeschrieben und dann in einer Standard PCR amplifiziert. Diese Methode erlaubt die indirekte Quantifizierung der RNA.

##### Material:

PCR-Maschine UNO Block (Biometra), High Pure RNA Isolation Kit (Roche), M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase (Promega),

RT-PCR-Ansatz:

- 2µg RNA (in DEPC-H<sub>2</sub>O)
  - 1µl Oligo- dT- Primer (50pmol/µl)
  - DEPC-H<sub>2</sub>O auf 14.5µl
- Denaturierung der RNA für 10min bei 65°C, danach für 2min in Eis abkühlen.
- 5µl First Strand Buffer
  - 0.5µl rNasin
  - 5µl 10mM dNTPs
  - 2.5µl 100mM DTT
  - 1µl M-MuLV RT

Der RT- Ansatz wurde für 1h bei 42°C inkubiert und die M-MuLV Reverse Transkriptase anschließend für 2min bei 95°C denaturiert. Die einsträngige cDNA wurde direkt in der anschließenden PCR- Reaktion eingesetzt.

2.2.1.3 DNA- Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch im Agarosegel (1% Agarose in TBE) aufgetrennt. Unter Zugabe von Ethidiumbromid konnte die DNA mittels UV-Licht visualisiert werden.

Lösungen:

10 x TBE: 108g Tris, 55g Borsäure, 20ml 0.5M EDTA pH 8, Milli Q ad 1l

2.2.1.4 Extraktion von DNA- Fragmenten aus dem Agarosegel

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) bzw. der GFX<sup>TM</sup>PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) verwendet.

2.2.1.5 Bestimmung der DNA- und RNA- Konzentration

Die Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration einer Probe erfolgte durch Messung der Absorption bei 260nm.  $A_{260}=1$  Doppelstrang- DNA entsprechen 50mg/ml DNA,  $A_{260}=1$  Einzelstrang- RNA entsprechen 40mg/ml RNA.

2.2.1.6 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Restriktionsverdau wurden mit Enzymen und entsprechenden 10 x Puffern der Firma Biolabs durchgeführt. Eine Einheit Enzym verdaut 1µg DNA in einer Stunde (bei optimalen Temperatur- und Pufferbedingungen). Es wurden 30µl, 50µl oder 100µl Verdauansätze durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden einer Hitzeinaktivierung nach Protokoll unterzogen oder die DNA- Fragmente aus dem Agarosegel (vgl. 2.2.1.4) extrahiert.

2.2.1.7 Dephosphorylierung von DNA

Bei ungerichteten Klonierungen (Schnittstelle am 5'- und 3'-Ende identisch) wurde die Vektor- DNA nach dem Restriktionsverdau an den 5'-Enden dephosphoryliert. Hierzu wurden 20µl Restriktionsansatz in 100µl Volumen in 2 sequentiellen Zyklen mit je 2 Einheiten

„Shrimp alkalischer Phosphatase“ (Roche) bei 37°C für je 30min inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 15min.

#### 2.2.1.8 Ligation von Insert- DNA in Vektor- DNA

Äquimolare Mengen Insert- und Vektor- DNA (ca. 250ng) wurden in einem Volumen von 20µl (2µl 10 x Ligationspuffer, 2U T4 DNA- Ligase (Roche)) für 16h bei 14°C ligiert oder mit Hilfe von LigaFast™ Rapid DNA Ligation System (Promega) 1h bei Raumtemperatur.

#### 2.2.1.9 Herstellen kompetenter Zellen (Rubidium- Chlorid- Methode)

##### Lösungen:

TFB1 (pH 5.8): 100mM RbCl, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 30mM KAc, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerol

Einstellung des pH-Wertes mit 0.2M Essigsäure auf pH 5.8, steril filtriert

TFB2 (pH 6.5): 10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerol

Einstellung des pH-Wertes mit KOH auf pH 6.5, steril filtriert

##### Durchführung:

Aus einem DH5α- bzw. BL21-Glycerinstock wurde auf eine LB- Agarplatte ausgestrichen, Inkubation bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden 5ml LB mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 100ml LB wurden auf 37°C vorgewärmt und mit 2ml Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer A<sub>600</sub> von 0.5 unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Kultur 5min auf Eis gekühlt und anschließend 5min bei 4000 rpm und 4°C in der Sorvall zentrifugiert (SS-34 Rotor). Im Anschluss Resuspendieren der Zellen in 40ml eiskaltem TFB1, 1.5 min auf Eis stehengelassen, 5min bei 4000 rpm und 4°C in der Sorvall zentrifugiert. Entfernen des Überstandes, resuspendieren des Pellets in 4ml eiskaltem TFB2. Inkubation 15min auf Eis. Die Zellen wurden in gekühlte Eppendorf-Tubes á 50µl aliquotiert auf Trockeneis schock gefroren und dann bei -70°C gelagert.

#### 2.2.1.10 Transformation von E. coli mit Plasmid- DNA

##### Material:

<b>E. coli- Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
ΔDH5α	<i>σvπ E44 del lacU169 (phi80 lacZ delM15) hsdR17 recA1 gyrA96 t hi-1 relA1]</i>	Sambrook et al.1989
BL21	B F <sup>-</sup> <i>omp T hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]</i>	Stratagene
TOPO10F <sup>-</sup>	F <sup>+</sup> { <i>lacI<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>) } mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZ?M15 lacX74 recA1 deoR araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen

##### Lösungen:

LB Medium (1l): 10g Baktotrypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl

LB Agar (1l): 10g Baktotrypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, 15g Agar

LB- Amp- Agarplatten: LB Agar, 100µg/ml Amp

Ampicillin- Stammlösung: 50mg/ml Ampicillin

#### Durchführung:

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 5-10µl Ligationsansatz oder anderer Plasmid- DNA (2ng), wurde der Transformationsansatz 20min auf Eis inkubiert.

Anschließend wurde ein Hitzeschock von 2min bei 42°C durchgeführt und nochmals 5min auf Eis inkubiert. Es wurde 1 ml LB Medium zugegeben und 1 h bei 37°C leicht geschüttelt.

Dann wurden die Zellen bei 2000rpm 3min pelletiert und in einem Volumen von 100 bis 200µl auf einer LB- Amp- Agarplatte ausplattiert. Inkubation über Nacht bei 37°C.

#### **2.2.1.11 Plasmidisolation aus *E. coli***

##### **„Mini-Präp“**

Zur Analyse der Klone aus der Transformation wurden von LB- Amp- Agarplatten Einzelkolonien gepickt und über Nacht in 3ml LB- Amp- Medium bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Die Plasmidisolation erfolgte mit dem QIAGEN Spin Kit. Die Plasmid- DNA aus 1.5ml Kultur wurde in 50µl Aqua dest. aufgenommen, 5-10µl wurden für die Analyse im Restriktionsverdau eingesetzt.

##### **„Easy-Präp“**

Alternativ wurde die Aufreinigung der Plasmid- DNA nach folgendem Protokoll realisiert: Das Zellpellet einer 1.5ml *E. coli* Kultur wurde in 50µl Lysepuffer: 15mM Tris HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, 15% Sucrose, 2mg/ml Lysozym, 0.2 mg/ml RNase A, 0.1mg/ml BSA für 5min bei Raumtemperatur resuspendiert. Nach einminütigem Kochen wurden die Proben für 1min im Eis gekühlt, woran sich 20min Zentrifugation bei 14000rpm anschloss. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß transferiert, die DNA mit 50 µl Isopropanol für 5min gefällt und 15min bei 14000rpm pelletiert. Daraufhin erfolgte ein Waschschriff mit 70% Ethanol und eine erneute Zentrifugation. Das DNA- Pellet wurde in 50µl A. dest. gelöst.

##### **„Midi Präp“**

Für die Amplifizierung von Vektor- DNA wurde eine Einzelkolonie in 5ml LB- Amp- Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 100ml LB- Amp- Medium wurden mit 100µl der Kultur beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Isolation der Plasmid- DNA erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit.

## **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Dabei wurde eine Absorptionseinheit mit 1µg/µl Protein kalkuliert.

Alternativ kam die Proteinbestimmung nach Bradford zur Anwendung, die Eichkurve wurde mit BSA hergestellt.

Material:

Photometer

Lösungen:

Bradford- Reagenz (BioRad), Proteinstandardlösung: BSA (10mg/ml),

0.9% NaCl in A. dest., pH7.5

Durchführung:

5µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 795µl 0.9% NaCl verdünnt und 200µl Bradford-Reagenz hinzu gegeben. Die Proben werden gemixt (Vortexer) und bei 595 nm die Extinktion gemessen. Mit Hilfe der Eichkurve wurden die finalen Proteinkonzentrationen ermittelt.

2.2.2.2 TCA/ NaDoc- Fällung von Proteinen

Die Präzipitation von Proteinen erfolgte durch Zugabe von 50% Trichloressigsäure (w/v; Endkonzentration 10%) und 1% Natriumdesoxycholat (Endkonzentration 0.1%). Die Proben wurden anschließend auf Eis für 30min inkubiert. Nach 15min Zentrifugation bei 4°C und 14000rpm, wurde zweimal mit je 1ml eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und jeweils 10min zentrifugiert. Anschließend wurden die Proteinpellets in SDS-Probenpuffer resuspendiert.

2.2.2.3 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)Material:

Minigelsystem BIORAD

Lösungen:

10 x SDS-Laufpuffer: 30.25g Tris HCl, 142.5g Glycin, 10g SDS

2 x SDS Probenpuffer: 40% Glycerol, 6% w/v SDS, 0.02M Tris HCl pH 7,  
0.1% w/v Bromphenolblau, 6% β- Mercaptoethanol

Acrylamidlösung: "rotiphorese Gel 30" (30% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid, w/v) Roth

4 x Sammelgelpuffer: 250mM Tris HCl pH 6.8, 0.8% w/v SDS

4 x Trenngelpuffer: 150mM Tris HCl pH 8.8, 0.4 % w/v SDS

Elektrophoresepuffer: 25mM Tris, 190mM Glycin, 0.1% w/v SDS

Molekulargewichtsstandard

Rainbowmarker (Amersham):

„high molecular weight marker“, 14.3 – 21.5 – 30 – 46 – 66 – 97.4 – 220 kDa

Prestained Marker (Biolabs):

„prestained protein marker, broad range“, 6.5 – 16.5 – 25 – 32.5 – 47.5 – 62 – 83 – 175kDa

Durchführung:

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in unterschiedlich konzentrierten Acrylamidgelen.

*15%iges Trenngel (Ansatz für 2 x 0.75mm Gele):*

5.6ml Acrylamidlösung, 2.8ml 4x Trenngelpuffer, 2.8ml A. dest., 30µl 10% APS,

3µl TEMED

*8%iges Trenngel (Ansatz für 1 großes 0.75 mm dickes Gel):*

9.9ml Acrylamidlösung, 7.5ml 4x Trenngelpuffer, 12.6ml A. dest., 180µl 10% APS,  
18µl TEMED

*4.5%iges Sammelgel:*

0.75ml Acrylamidlösung, 1.25ml 4x Sammelgelpuffer, 1.75ml A. dest., 15µl 10% APS,  
1.5µl TEMED

Nach Zugabe von 2x Probenpuffer wurden die Proben für 5min bei 95°C im Heizblock erhitzt und anschließend 1min bei 13000rpm zentrifugiert.

Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von maximal 120 V.

#### 2.2.2.4 Elektrotransfer von Proteinen aus SDS- PAG auf Immobilon Membran

##### Material:

Semi dry- Blotkammer (pEQLAB)

WHATMAN Papier

Immobilon® Membran (Millipore)

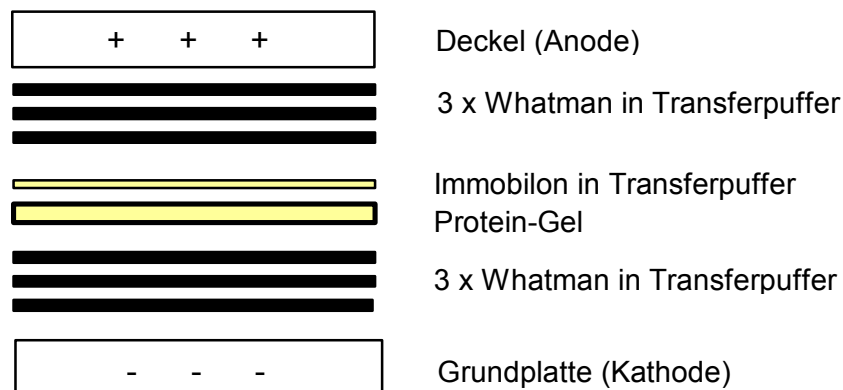
##### Lösungen:

Transferpuffer: 2,4g Tris; 11,3g Glycin; 200ml Methanol; 800ml A. dest. (pH 8.1)

Coomassiefärbung für Immobilon Membran: 1% Coomassie R250 in 50% MetOH

Ponceau- Rot: 0.2% w/v in 3% TCA (Sigma), Entfärbung mit Wasser

##### Transfer-Aufbau (Semidry):



##### Durchführung:

Der Proteintransfer erfolgte innerhalb 1h bei 400mA. Die Transfereffizienz wurde durch Färbung der Membran entweder mit Ponceau- Rot- Lösung oder Coomassiefärbung nachgewiesen, Entfärbung im Anschluss mit A. dest., respektive Entfärber (50% Methanol). Der Molekulargewichtsstandard wurde zur späteren Identifizierung markiert.

#### 2.2.2.5 Identifizierung von Proteinen mittels Immunodetektion (ECL)

##### Lösungen:

1 x PBS: 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3

1 x TBS: 10 mM Tris HCl, 150mM NaCl, pH 7.5

TBS-Tween/Triton-Puffer: 1 x TBS, 500mM NaCl, 0.05% Tween20, 0.2% TritonX-100  
pH 7.5 (Waschpuffer für His-Antikörper)

Blocklösung: PBS, 5% w/v Magermilchpulver, 10% Pferdeserum, 0.2% TWEEN-20  
für His- Antikörper: TBS, 3% w/v BSA

Waschlösung (PBS/T): PBS, 0.1% TWEEN-20

1. Antikörper (PBS/T): entsprechende Verdünnung in PBS, 5% w/v Magermilchpulver, 0.1% TWEEN-20, anti-His Antikörper wurden in TBS, 3% w/v BSA suspendiert

2. Antikörper: Peroxidase- gekoppelter Antikörper „Ziege anti Kaninchen IgG“ (DIANOVA) 1:10000 verdünnt in PBS/T, 5% w/v Magermilchpulver; Peroxidase- gekoppelter Antikörper „Kaninchen anti Maus IgG“ (DIANOVA) 1:10000 in TBS, 10% w/v Magermilchpulver

ECL- Reagens: 20ml 100mM Tris HCl pH 8.5 + 44µl 90mM Coumarinsäure + 100µl 250mM Luminol (3-Aminophtalhydrazid in DMSO) + 6µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### Durchführung:

Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Immobilon Membranen für 1h in Blocklösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation der Membran mit der 1. Antikörperlösung erfolgte über Nacht bei 4 °C oder über 1h bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen der Membran für je 10min mit PBS/T erfolgte die Inkubation mit der 2. Antikörperlösung während 1h bei Raumtemperatur. Danach wurde wiederum viermal mit PBS/T je 10min gewaschen. Ein zehnminütiger Waschschrift mit 1 x PBS schloss sich an. Die Peroxidasereaktion wurde in der Dunkelkammer durchgeführt. Dazu wurde die Membran 1min in ECL- Reagens inkubiert und anschließend luftblasenfrei in Folie verpackt. Die Reaktion wurde mittels Röntgenfilm (XOMAT-UV von KODAK) detektiert.

#### 2.2.2.6 Coomassiefärbung von SDS- Minigelen

##### Lösungen:

Färbelösung: 10% Methanol, 40% Eisessig, 0.25% w/v Coomassie R250,  
(Farbstoff in Methanol über Nacht lösen, filtrieren)

Entfärber: 10% Eisessig, 40% Methanol

##### Durchführung:

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die SDS- Polyacrylamidgele 30min gefärbt, anschließend für 60min entfärbt. Die Gele wurden innerhalb von 2h bei 60°C getrocknet.

#### 2.2.2.7 Native Gelelektrophorese und Substrat- Overlay

Zur Überprüfung der Aktivität der gereinigten 20S- bzw. 26S-Proteasoms wurde je 1µg Proteasom mit Bromphenolblau versetzt und anschließend auf ein PhastGel aufgetragen. Die Proteine wurden bei 110Vh getrennt, die Gele im Verlauf einem Substrat- Overlay mit 100µM Bz-VGR-AMC in 50mM Tris HCl pH 8.5 unterzogen (2ml overlay, Inkubation für



15min bei 37°C). Die Fluoreszenz der abgespaltenen AMC- Gruppe wurde auf dem UV-Tisch detektiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Gele mit Coomassie.

#### 2.2.2.8 Aufreinigung von pp89 (56kDa)

##### Material:

Bioradsäule 20ml, Spectra Por® Membrane (Spectrum), Ni- NTA- Agarose (Qiagen)

##### Lösungen:

LB-Medium, 50mg/ml Ampicillin- Stammlösung, 1M IPTG, 100mM PMSF (in 100% Isopropanol), Proteinaseinhibitor- Cocktail Complete® (Roche), Nickel- NTA- Agarose (Qiagen)

PBS: 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3

Lysepuffer: 6M Gua HCl, 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01M Tris HCl,  
15mM β- Mercaptoethanol, 1% Tween 20, pH 8.0

Waschpuffer A: 8M Harnstoff, 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01M Tris HCl, pH 6.3

Waschpuffer B: 8M Harnstoff, 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01M Tris HCl, 1.5M NaCl,  
1% Tween 20, pH 6.3

Elutionspuffer: 8M Harnstoff, 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01M Tris HCl, pH 4.5

Dialysepuffer: 0.5M Harnstoff, 0.01M Tris HCl, pH 7.5

##### Durchführung:

Von einer LB- Amp- Agarplatte wurden transformierte Einzelkolonien gepickt und über Nacht in 3 ml LB- Amp- Medium bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Danach wurde eine 500ml LB- Lösung mit der Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD von etwa 0.4-0.5 geschüttelt. Nun erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 1mM IPTG, weiterhin wurde 1mM PMSF zur Inhibition von Proteasen hinzu gegeben. Nach 2stündiger Expression bei 37°C wurden die Zellen durch eine Zentrifugation für 10min, bei 4°C und 6000rpm pelletiert, im Anschluss mit 10ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte bei Raumtemperatur für 30min durch Resuspension in 14 ml Lysepuffer unter gleichzeitiger Zugabe von 1.5ml Proteinaseinhibitor- Cocktail. Nach 25min Zentrifugation bei 12500rpm wurde der Überstand zu 2ml 50% Ni- NTA- Agarose Suspension transferiert. Die Bindung des His- getaggtten Proteins erfolgte innerhalb 1h bei Raumtemperatur. Dieses Gemisch wurde in eine Bioradsäule überführt. Die ungebundenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Nickelagarose wurde wie folgt gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen: 15ml Waschpuffer A, 15ml Waschpuffer B, 2 x 15ml Waschpuffer A. Das His- getaggte Protein wurde unter Zugabe von 10ml Elutionspuffer von der Nickelagarose eluiert. Das Eluat wurde dann gegen 2l Puffer für 16h bei 4°C dialysiert.

### 2.2.2.9 Proteinsequenzierung

Die N- terminalen Proteinsequenzierungen (Edman- Abbau) sowie der tryptische Verdau des rekombinanten pp89 mit anschließender Massenspektrometrie wurden von Frau Dr. R. Kraft (MDC, Berlin-Buch) durchgeführt.

### 2.2.2.10 CD- Spektrum

Das CD- Spektrum für das rekombinante pp89 wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. M. Dathe und Frau H. Nikolenko aus der AG Peptidchemie am FMP in Berlin- Buch aufgenommen (Jasco J-720 Spektrometer). Das Protein wurde dazu erneut gegen 10mM Tris HCl, pH 7.5 dialysiert und bei einer Endkonzentration von  $1.8 \cdot 10^{-5} \text{M}$  analysiert. Die Sekundärstruktur wurde mit dem Deconvolutionsprogramm CDNN bestimmt (Böhm 1992).

### 2.2.2.11 Aufreinigung von ODC/pp89 Fusionsprotein (77kDa)

#### Material:

French® Pressure Cell Press (SLM-Aminco) , Bioradsäule 20ml, S&S Biotrap® Elektroelutionskammer (Schleicher & Schnell), Centricon® Plus-50 (Millipore), Ni- NTA- Agarose (Qiagen)

#### Lösungen:

LB-Medium, 50mg/ml Ampicillin- Stammlösung, 1M IPTG, 100mM PMSF (in 100% Isopropanol), Proteinaseinhibitor- Cocktail Complete® (Roche), Nickel- NTA- Agarose (Qiagen), 0.3M  $\text{CuCl}_2$  in A. dest., PBS pH 7.3

Lysepuffer: 8M Harnstoff, 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.01M Tris HCl, pH 8.0

Waschpuffer: 8M Harnstoff, 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.01M Tris HCl, pH 6.3

Elutionspuffer: 8M Harnstoff, 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.01M Tris HCl, pH 5.0

Elektroelutionspuffer: 25mM Tris HCl, 192mM Glycin, 0.025% SDS, 0.5M Harnstoff, pH 8.6

#### Durchführung:

Die Kultur der Bakterien und Expression des Fusionsproteins erfolgten wie oben erläutert (insgesamt 1500ml Bakteriensuspension, 3h Expression bei 37°C). Nach dem Waschen des Pellets mit 1 x PBS wurde unter Zugabe von Proteaseinhibitoren selbiges mit 20ml Puffer lysiert und die Zellen zusätzlich drei aufeinander folgenden Zyklen eines Aufschlusses mittels French Press unterzogen. Nach Zentrifugation (13000rpm, 15 min) erfolgte die Bindung des Fusionsprotein für 1.5h an 2ml Ni- NTA- Agarose. Das Gel wurde im Verlauf mit 4 x 15ml Waschpuffer von unspezifisch gebundenen Proteinen gereinigt. Das His- getaggte Protein wurde mit 20ml Elutionspuffer extrahiert. Das Eluat wurde mit Hilfe eines Centricon® Plus-50 (Millipore) auf ein Volumen von etwa 1ml eingeeengt, wobei niedrigmolekulare koeluierte Proteine bereits abgetrennt wurden. Das konzentrierte Eluat wurde dann vollständig in einer SDS-PAGE (10%ige Gele) aufgetrennt und die Gele im Anschluss mit  $\text{CuCl}_2$  gefärbt. Dazu wurde das Gel in A. dest. 3min gewaschen, dann für 5min in 0.3M  $\text{CuCl}_2$ -Lösung inkubiert und anschließend mit A. dest. gespült. Die entsprechenden

Proteinbanden wurden aus dem Gel hinaus geschnitten. In einer Proteinelektroelutionskammer (S&S Biotrap) konnte das Protein über 16h bei  $U=100V$  aus dem Gel extrahiert werden (Elektroelutionspuffer). Es erfolgte eine weitere Konzentrierung und Dialyse mit Centricon® Plus-50.

#### 2.2.2.12 Aufreinigung von Antizym

##### Material:

French® Pressure Cell Press (SLM-Aminco), Bioradsäule 20ml, FPLC Äkta (Amersham Pharmacia), MonoQ- Säule (Pharmacia), Amylose- Resin (Biolabs)

##### Lösungen:

LB-Medium, 50mg/ml Ampicillin- Stammlösung, 1M IPTG, 100mM PMSF (in 100% Isopropanol), Amylose- Resin (Biolabs), PBS pH 7.3

Phosphatpuffer:  $Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4$  pH 7.0, 1mM PMSF, 1mM EDTA

Elutionspuffer:  $Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4$  pH 7.0, 1mM PMSF, 1mM EDTA, 10mM Maltose

Puffer A: 25mM Tris HCl, 100mM NaCl, 1mM DTT ad 1000ml Milli Q, pH 7.6, steril filtriert, entgast

Puffer B: 25mM Tris HCl, 1M NaCl, 1mM DTT ad 1000ml Milli Q pH 7.6, steril filtriert, entgast

Dialysepuffer: 10mM Phosphatpuffer, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.4

##### Durchführung:

Die Proteinexpression erfolgte wie bereits bei unter 2.2.2.8 beschrieben. Für die Expression des Antizyms wurden 300ml Bakteriensuspension für 20h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ernte der Zellen wurde das Pellet in 5ml Phosphatpuffer resuspendiert und einer Lyse in 4 konsekutiven Zyklen mittels French Press unterzogen. Dann erfolgte die Inkubation des zuvor zentrifugierten Überstands (10.000rpm, 4°C, 10min) mit 2ml eines 50%igen Amylose-Gels für 1h bei Raumtemperatur. Nach Überführung des Gemischs in eine Säule wurde das Gel mit 20ml Phosphatpuffer gewaschen. Durch Zugabe des Elutionspuffers (10ml) konnte das Antizym isoliert werden. Das Eluat wurde gegen 2l Puffer für 16h bei 4°C dialysiert. Das Dialysat wurde dann 1:2 mit Puffer A verdünnt und filtriert. Die Probe wurde über einen Superloop auf die MonoQ- Säule HR5/5 geladen und getrennt. Das Antizym wurde durch steigende Salzkonzentration (Puffer B bis 100%) mit einer Flussrate von 1ml/min eluiert. Die Peakfraktionen wurden gepoolt und rechromatographiert.

#### 2.2.2.13 Aufreinigung von 20 S Proteasomen

##### Material:

Erythrozytenkonzentrate (280-320ml), DEAE- Sephacel 17-0500-01 (Pharmacia)

Chromatographie-Säule Ø 2.5cm x 20cm (Biorad)

96-well Mikrotiterplatten (Greiner), Fluoreszenz - Mikrotiterplatten - Reader (SLT)

Diaflo Membranen XM300 AMICON Ausschlussgröße 300 kDa, Ø 43 mm (Millipore)

Gradientenmischer, SW 40 Zentrifugenröhrchen (polyallomer centrifuge tubes, Beckman-Coulter),

MonoQ- Säule HR5/5, FPLC Äkta (Amersham Pharmacia)

#### Lösungen:

1 x PBS: 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3

10 x TEA: 200mM Tris HCl, pH 7.2 (20°C), 10mM EDTA, 10mM NaAzid

Arbeitspuffer (= TEAD- Puffer): 1 x TEA, 1mM DTT

Arbeitspuffer A: 1 x TEAD, 100mM NaCl, filtriert und entgast

Arbeitspuffer B: 1 x TEAD, 500mM NaCl, filtriert und entgast

Ammoniumsulfat, 10% Triton X-100

Saccharosegradient A: 10% Saccharose in 1 x TEAD-Puffer, 50mM NaCl

Saccharosegradient B: 40% Saccharose in 1 x TEAD-Puffer, 50mM NaCl

Assay- Puffer: 50mM TrisHCl, pH 7.8, 1mM DTT, 0.5mM EDTA

10mM Z-GGL-AMC (Substrat für chymotrypsinähnliche Aktivität) in DMF (Bachem)

#### Durchführung:

Die Präparation von 20 S Proteasomen erfolgte aus humanen Erythrozyten.

##### 1. Zellaufschluss:

Die Erythrozytenkonzentrate wurden dreimal mit 1 x PBS gewaschen (Zentrifugation 12min, 980rcf, 4°C). Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet im Verhältnis 1:2 in 1 x TEAD resuspendiert und 0.1% Triton X-100 zugegeben. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde die Suspension für 1h bei 4°C gerührt. Anschließend wurden die Membranen durch Zentrifugation abgetrennt (90min, 10000rpm, 4°C).

##### 2. DEAE-Ionenaustauschchromatographie:

Etwa 50 ml des äquilibrierten DEAE- Sephacels wurden mit dem Lysat (dekantierter Überstand) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Gel-Suspension wurde in eine Chromatographie-Säule gefüllt und mit Puffer A (1 x TEAD, 100mM NaCl) gewaschen bis kein Protein mehr im Durchlauf erschien (Kontrolle mit Ponceau S). Im Anschluss wurden die noch gebundenen Proteine mit Puffer B (1 x TEAD, 500mM NaCl) in 15ml Fraktionen eluiert. Der Proteinnachweis erfolgte wiederum mit Ponceau S auf Nitrocellulose.

##### 3. Proteasomen- Aktivitätsbestimmung (Mikrotiterplatten)

Das Substrat (Z-GGL-AMC) wurde frisch in den Assay- Puffer gegeben (20µM Endkonzentration). Jeweils 10µl Probe bzw. 10µl Wasser (Referenzwert) wurden in die Kavitäten einer schwarzen Mikrotiterplatte pipettiert. Dazu wurden 100µl Assay- Substrat- Puffer gegeben. Nach Inkubation dieses Reaktionsansatzes für 60 min bei 37°C erfolgte die Messung der Fluoreszenz der freigesetzten AMC- Gruppe bei einer Emissions-Wellenlänge von 460nm (Anregung bei 390nm) in einem Fluostar- Platten- Reader (SLT). Fraktionen hoher Aktivität wurden vereinigt und, wie unter 4. beschrieben, weiter bearbeitet.

#### 4. Ammoniumsulfat-Fraktionierung

Das 20S Proteasom fällt zwischen 38-75% Sättigung an Ammoniumsulfat aus. Zunächst wurde die Probe mit festem Ammoniumsulfat auf eine 35%ige Sättigung an Ammoniumsulfat eingestellt. Die Probe wurde in ein Eisbad gestellt und das Salz sehr langsam unter ständigem Rühren zugegeben. Anschließend wurde die Probe weitere 15min zur Gleichgewichtseinstellung gerührt und der Niederschlag bei 17000rpm für 10min abzentrifugiert. Das Proteasom wurde durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer 75%igen Sättigung aus dem Überstand gefällt. Das gefällte Protein wurde durch Zentrifugation präzipitiert und der Niederschlag durch Zugabe von 750µl 1 x TEAD- und 50mM NaCl- Puffer gelöst (im Eisbad unter vorsichtigem Schwenken).

#### 5. Saccharose- Dichtegradienten- Ultrazentrifugation und SDS-PAGE

Der Saccharosegradient wurde aus 10%- und 40%igen Saccharoselösungen (je 6.5ml) hergestellt. Der Gradient wurde vorsichtig mit der vollständig gelösten Probe (1ml) überschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte über 16h bei 40000rpm, 4°C (SW 40-Rotor (Beckman-Coultern)). Die Gradienten wurden in 0.6ml Fraktionen in Eppendorf- Gefäße fraktioniert und die proteolytische Aktivität bestimmt. Die proteolytisch aktiven Fraktionen wurden vereinigt und einer Dialyse für 16h bei 4°C unterzogen (Dialysepuffer: 1 x TEAD, 100mM NaCl).

#### 6. FPLC

Die dialysierten Proben wurden in Puffer A verdünnt und nicht- gelöstes Protein durch Filtration mit einem 0.2µm Filter entfernt. Die Probe wurde auf eine äquilibrierte Anionenaustauschersäule (MonoQ- Säule) mit einer Flussrate von 1ml/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit Puffer A gewaschen und die Proteine mit einem linearen NaCl- Gradienten eluiert (5ml: 0- 20% B, 20ml: 20-40% B, 2ml: 40-100% B, 5ml: 100% B, 2ml: 100-0% B, 5ml: 0% B). Während der Elution mit 20-40% Puffer B wurden 1ml Fraktionen gesammelt. Das 20S Proteasom befindet sich in den Fraktionen mit 30% des Puffers B (ca. 270mM NaCl). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden erneut, wie unter 3. beschrieben, auf ihre proteolytische Aktivität getestet und bei 280nm (für Proteasom:  $OD_{280nm}$  von 1 entspricht 720µg/ml) quantifiziert. Die proteasomhaltigen Fraktionen wurden gepoolt. Die Reinheit des isolierten Proteasoms wurde in einer 15%igen SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung kontrolliert.

##### 2.2.2.14      *Aufreinigung von 26S Proteasomen*

Die Aufreinigung von 26S Proteasomen erfolgte aus humanen Erythrozyten. An dieser Stelle sei Dr. B. Braun herzlich gedankt, die die Aufreinigung vorgenommen hat und das 26S Proteasom zur Verfügung stellte (Braun 1999, 65). 26S Proteasomen wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bei -70°C gelagert:

Puffer:            20mM Tris HCl, pH 7.2, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 10% Glycerin, 0.5mM ATP

### 2.2.2.15 Aufreinigung von Immunoproteasomen und PA28

Die Aufreinigung von Immunoproteasomen und dem Proteasomaktivator PA28 erfolgte nach Kuckelkorn *et al.* (Kuckelkorn 2002). An dieser Stelle sei herzlich Frau Dr. U. Kuckelkorn und Frau I. Drung gedankt, die diese Proteasomkomponenten freundlicherweise zur Verfügung gestellt haben.

### 2.2.2.16 Aufreinigung von His-Ubi mit Ni- NTA-Agarose aus B8 Zell- Lysaten

#### Material:

Ni- NTA- Agarose (Qiagen), Biorad- Säulen

#### Lösungen:

Lysepuffer: 8M Harnstoff, 0.1M Phosphatpuffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ),  
pH 8.0, 5mM Imidazol

Waschpuffer: 8MHarnstoff, 0.1M Phosphatpuffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ),  
pH 6.1, 5mM Imidazol

Proteinpuffer: 50mM Phosphatpuffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), pH 8.0, 100mM KCl,  
20% Glycerol, 0,2% NP40

#### Durchführung:

B8- Zellpellets wurden in 6ml Lysepuffer resuspendiert und 1h bei Raumtemperatur rotiert. Nach Trennung des Überstandes durch Zentrifugation wurde diesem 1.5ml Ni- NTA- Agarose zugegeben und dieser Ansatz für 16h bei 4°C geschüttelt. Nach Transfer in Säulen wurde das Gel wie folgt gewaschen: 3ml Lysepuffer, 8ml Waschpuffer, 4ml Lysepuffer, 3ml Lysepuffer/Proteinpuffer 1:1, 3ml Lysepuffer/Proteinpuffer 1:2, 3ml Lysepuffer/Proteinpuffer 1:3, 3ml Proteinpuffer + 10mM Imidazol. Eluiert wurden 4 Fraktionen á 1ml mit Proteinpuffer + 250mM Imidazol. Die Eluate wurden mit 10% TCA gefällt und mittels SDS-PAGE und Western blot analysiert.

### 2.2.2.17 Proteolytische Verdaus mit mCMV pp89

#### Material:

pp89 Peptid (2µg/µl) 25mer Kloe 1: RLMYDM**YPHFMP**TNLGPSEKRVWMS  
rekombinantes pp89

#### Lösungen:

10 x Verdaupuffer: 200mM HEPES, 20mM MgAc, pH 7.8

für 26S Proteasom Verdaus zusätzlich: 40mM DTT, 25mM Mg-ATP, 400mM  
Kreatininphosphat, 50µg/ml Kreatininkinase

#### Durchführung:

*Verdau von pp89 25mer (300µl Verdauansatz):*

1µg 20S Proteasom, 10µg pp89 (25mer), 1 x Verdaupuffer, 2mM DTT

Inkubation bei 37°C; Entnahme von je 40µl nach 0, 1h, 2 h, 8h und 20h, Stopp durch Zugabe von 3µl 1% TFA

*Verdau von rek pp89 mit 20S (450 µl Verdauansatz):*

3 µg c20 S bzw. i20S Proteasom, 50 µg pp89 (56 kDa), 18 µg PA 28,  
1 x Verdaupuffer, 2 mM DTT

Inkubation bei 37 °C; Entnahme von je 50 µl nach 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 und 20 h, Stopp durch Zugabe von 5 µl 1 % TFA

Wiederholung der Ansätze mit Inhibitoren: 1 mM PMSF, 10 µM MG132, 2 µM Epoxomicin, 10 µM AAF-CMK (Ala-Ala-Phe-Carboxymethylketon), je 1 µl Pepstatin (0.7 mg/ml), Leupeptin (1 mg/ml), Aprotinin (2 mg/ml), Bestatin (4 mg/ml), Hemin (1 mg/ml), Trypsininhibitor (10 mg/ml), 50 µM N-Ethylmaleinamid.

*Verdau von rek pp89 mit 26S (450 µl Verdauansatz):*

4 µg 26S Proteasom, 50 µg pp89 (56 kDa), 1 x Verdaupuffer, 2 mM DTT, 5 mM Mg-ATP, 5 mM Kreatinphosphat, 50 ng/µl Kreatinkinase

Inkubation bei 37 °C; Entnahme von je 50 µl nach 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 und 20 h, Stopp durch Zugabe von 5 µl 1 % TFA

**2.2.2.18**      *Proteolytische Verdau mit dem ODCpp89 Fusionsprotein*Lösungen:

1 M Tris HCl, pH 7.4, 1 M MgCl<sub>2</sub>, 0.2 M DTT, 100 mM ATP, 0.5 M Kreatinphosphat, 50 µg/ml Kreatinkinase

Durchführung:

Für den Verdau und die anschließende massenspektrometrische Analyse des ODCpp89-Fusionsproteins soll die finale Glycerolkonzentration unter 2%, die finale Salzkonzentration unter 50 mM liegen und das stöchiometrische Verhältnis von Antizym zu ODC etwa 5:1 betragen. Das 26S Proteasom wurde in Tris HCl Puffer und 10% Glycerol bei -80 °C gelagert.

**Verdauansatz:**      40 mM Tris HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1 mM ATP, 10 mM Kreatinphosphat, 50 ng/µl Kreatinkinase, 10 nM 26S Proteasom (13.4 µg), 50 nM ODCpp89 Fusionsprotein (4 µg), 11 µg Antizym

Die Wiederholung der Ansätze erfolgte unter Zugabe von 10 µM MG132 oder 2 µM Epoxomicin. Insgesamt hatten die Proben ein Volumen von 80 µl pro Ansatz. Der Verdau wurde bei 37 °C durchgeführt. Nach 0, 4 und 20 h wurden jeweils 25 µl entnommen und die Reaktion mit 2.5 µl 1 % TFA gestoppt.

**2.2.2.19**      *Analytische HPLC*Material:

HPLC System Gold, Detektor 166 (Beckman-Coulter),

HPLC Säule: Micra NPS ODS-I 1,5 µm Säule, PC 33x4.6 mm (Bischoff chromatography)

Lösungen:

Puffer A:      0.1 % Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser (v/v), entgast

Puffer B:      0.1 % TFA in Acetonitril (v/v), entgast

### Durchführung:

Ein 20µl Aliquot der jeweiligen proteasomalen Verdaus (0 bzw. 20h) wurde mittels einer RP-HPLC über eine NPS RP18 1.5µm Säule (MICRA) getrennt.

Flussgeschwindigkeit: 0.2ml/min auf 1ml/min (2min), dann 1ml/min;

Gradient: 0-5min 5% B; 5-20min linear auf 30% B; 20-22min von 30% auf 100% B; 22-24min 100% B; 24-26min linear auf 0% B; 26-30min  
Reäquilibration bei 0% B

Die Detektion erfolgte bei 220 nm.

#### 2.2.2.20 Massenspektrometrie

Die Analyse der Proben wurde freundlicherweise von Dr. K. Janek durchgeführt. 30µl der Verdauansätze wurden mittels RP-HPLC aufgetrennt (Hewlett Packard 1100 ausgestattet mit einer µRPC C2/C18 SC 2.1/10 Säule, PHARMACIA). Eluent A: 0.05% TFA in Wasser; Eluent B: 70% Acetonitril in Wasser, 0.05% TFA; Gradient: 5-95% Eluent B in 15min; Flussrate 70 µl/min; die aufgetrennten Peptidfragmente wurden direkt am Tandemquadrupol Massenspektrometer (ESI *electrospray ion source* TSQ 7000, Finnigan MAT) gemessen (m/z=300-1300 in 3 s).

### **2.2.3 Zellkultur**

#### 2.2.3.1 Verwendete murine Zelllinien

C4: embryonale Fibroblastenzelllinie aus BALB/c Mäusen generiert  
B8: C4 Zellen, stabil transfiziert mit MCMV IE1-Gen, Expression von pp89, Antibiotikaresistenz: 250 µg/ml G-418 Sulfat (Gibco BRL)  
P815: Tumormastzelllinie mit H-2<sup>d</sup> Hintergrund

#### 2.2.3.2 Lösungen für die Zellkultur

Basal Iscove Medium, RPMI- Methionin- freies Medium, Trypsin/EDTA- Lösung, Kalzium-Magnesium freies Medium (Ca<sup>++</sup>- Mg<sup>++</sup>- freies Medium)

Iscove Medium komplett: 10% FCS, 100mg/ml Penicillin/Streptomycin, 2mM L-Glutamin

Einfriermedium: Iscove Medium mit 30% FCS, 10% DMSO

2 x HBS Puffer: 280mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12mM Dextrose, 50mM Hepes pH 7.05, steril filtriert, Aliquots bei -20°C gelagert

Antibiotikastammlösungen: G-418 Sulfat 100mg/ml (GibcoBRL)

#### 2.2.3.3 Kultur von adhärenenten Zellen

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Wasserdampf kultiviert. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturschale erfolgte nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS durch Trypsinierung mit Trypsin / EDTA- Lösung (GibcoBRL) oder durch Zugabe von Kalzium-, Magnesium- freiem Medium. Zentrifugationen wurden bei 200 x g und 4°C für 5min ausgeführt.



#### 2.2.3.4 Einfrieren und Auftauen

1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml wurden pelletiert und in eiskaltes Einfriermedium aufgenommen, anschließend in Einfrier Röhrchen überführt und in einer eisgekühlten Isopropanol- Einfrierbox (Nalgen) für mindestens 2h bei -70°C progressiv (1°C/min) gefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Das Auftauen erfolgte unter leichtem Schwenken im 37°C Wasserbad. Die Zellen wurden in ein Röhrchen (15ml) überführt, tropfenweise wurden 10ml eiskaltes Iscove Medium zugegeben, anschließend zentrifugiert und die Zellen in frischem Medium in 6 oder 10cm Schalen kultiviert.

#### 2.2.3.5 Kalziumphosphat- Transfektion adhärenter Zellen

Jeweils 10µg Plasmid- DNA, die das zu transfizierende Gen kodieren (bei transienten Transfektionen ohne Resistenzgen, bei stabilen in Anwesenheit eines Resistenzgens für die spätere Selektion), wurden mit 2.5Vol 96%igem Ethanol und 0.1Vol 3M NaCl für 30 min bei -20 °C gefällt und 10min bei 4°C, 14000rpm zentrifugiert. Danach wurden die Pellets mit 1.5ml 70%igem Ethanol gewaschen und einem weiteren Zentrifugationsschritt unterzogen. Nach Dekantieren des Ethanols erfolgte eine Lufttrocknung der Pellets unter der sterilen Arbeitsbank. Anschließend wurde die DNA in 219µl sterilem A. dest. resuspendiert und nach Zugabe von 31µl 2M CaCl<sub>2</sub> in ein 5ml Polypropylenröhrchen überführt. Danach wurden unter sehr langsamem Mischen auf dem Vortexer 250µl 2 x HBS- Puffer zugetropft (innerhalb 1min, die Tropfen wurden gegen die Röhrcheninnenwand pipettiert). Das Gemisch wurde 30min bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise in das Medium der Zielzellen gegeben. Die Zielzellen wurden am Vortag von einer exponentiell wachsenden Kultur in eine 10 cm Schale ausplattiert, so dass die Zellen am Tag der Transfektion etwa 50% konfluent waren (ca. 1 x 10<sup>6</sup> Zellen). Nach 4 bis 6h erfolgte ein Glycerolschock (das Medium wurde abgesaugt, 2ml 10% Glycerol in 1 x PBS für 1.5min hinzu gegeben, im Anschluss 2 x mit 5ml PBS gewaschen und 10ml frisches Iscove Medium hinzu pipettiert). Alternativ zur Glycerolgabe wurde das Medium nach 16h Kultivierung gewechselt. Je nach Fragestellung wurden 6µM MG132 (10mM stock in DMSO) bzw. DMSO (Kontrolle) 2h vor dem Ernten der Zellen ins Medium hinein pipettiert. Nach 48h wurden die Zellen (transiente Transfektion) geerntet und lysiert.

#### 2.2.3.6 Lyse der kultivierten Zellen

Lysepuffer: 50mM Tris HCl pH 8.0, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 0.1% Triton X-100, steril filtriert pro ml Lysepuffer folgende Proteaseinhibitoren: 5µl 100mM PMSF, 3,3µl Aprotinin (2mg/ml), 1µl Leupeptin (1mg/ml), 1µl Pepstatin (0.7mg/ml), 1µl Hemin (1mg/ml), 1µl Bestatin (4mg/ml), 50µM N- Ethylmaleinamid, 10µM AAF-CMK, 10µM MG132

Die Zellpellets wurden in Lysepuffer resuspendiert und 3 alternierenden Zyklen Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und Erwärmen auf 37°C ausgesetzt. Im Anschluss wurde das Lysat bei 14000rpm, 4°C für 15min zentrifugiert und der Überstand

weiterverarbeitet. Es erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (vgl. 2.2.2.1).

#### 2.2.3.7 Test der Transfektanten

mittels RT-PCR (transiente Transfektanten):

Die Aufreinigung und Isolation der Gesamt- RNA erfolgte entsprechend des Protokolls „High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche), etwa  $2 \times 10^6$  Zellen wurden in 400µl PBS resuspendiert. Weiteres Procedere wie unter 2.2.1.2 beschrieben.

#### 2.2.3.8 Pulse-Chase-Experimente

##### Material:

Schwefel Nuklid  $^{35}\text{S}$  Translabel (ICN) 0.2mCi/ml in Iscove Medium

##### Lösungen:

50mM Tris HCl pH 8.0, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM EDTA, 0.5% Triton X-100, steril filtriert

##### Durchführung:

Mit His- Ubi bzw. HA- Ubi transfizierte Zellen wurden 36h nach Transfektion mit 1.4mCi  $^{35}\text{S}$  markiert (pulse). Dazu wurden die Kulturschalen ( $\varnothing$  10cm) mit den adhärenen Zellen mit 1 x PBS gewaschen und für 30min mit 2ml Methionin- freiem RMPI- Medium bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 7ml  $^{35}\text{S}$  (0.2mCi/ml) in Iscove Medium (Gesamtaktivität 1.4mCi) für 30min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das radioaktive Medium entfernt und die Zellen mit Iscove Medium bei 37°C inkubiert (chase). Nach entsprechenden Zeiten (chase→0, 1, 2, 4, 8h) wurden die Zellen mit 5ml 1 x PBS gewaschen und unter Zugabe von 1ml Lysepuffer (2min stehen lassen) geerntet und gleichzeitig lysiert. Die Lysate wurden in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -20°C gelagert. Die Immunopräzipitation ist unter 2.2.4.4 erläutert.

### **2.2.4 Immunbiologische Methoden**

#### 2.2.4.1 Kultivierung der pp89 spezifischen zytotoxischen T-Zellen

Die Herstellung, Kultivierung und Klonierung der pp89 spezifischen zytotoxischen T- Zellen wurde von Frau Dr. U. Salzmann durchgeführt (Dissertation „Untersuchungen zur antigenprozessierenden Funktion des Proteasoms,“ 2003). Sie hat diese CTLs freundlicherweise zur Verfügung gestellt, meinen herzlichsten Dank an dieser Stelle.

Die eingefrorenen CTLs wurden vor dem Experiment expandiert und restimuliert. Von einer murinen Milz (BALB/c Mäuse) wurden Zellsuspensionen hergestellt. Hierzu wurde das Organ durch ein Edelstahlnetz gestrichen und zweimal mit 10ml Iscove Medium gewaschen (1200rpm, 7min, 4°C). Für die Restimulierung wurden Milzzellen nicht immunisierter BALB/c Mäuse mit 10nM pp89-9mer (YPHFMPNTNL) 1h bei 37°C beladen und anschließend mit 3000rad gamma bestrahlt. Pro Kavität wurden  $5 \times 10^7$  peptidbeladene Milzzellen sowie 10nM pp89-9mer zugesetzt. Nach Expansion der spezifischen CTLs erfolgte die wöchentliche Restimulierung mit  $1 \times 10^7$  CTLs und  $1 \times 10^7$  peptidbeladenen Stimulatorzellen pro Kavität in

Anwesenheit von 25U/ml murinem IL-2. Die stimulierten CTLs wurden am Tag 5 nach der Restimulierung mit IL-2 für die Experimente eingesetzt.

#### 2.2.4.2 Klonierung der pp89 spezifischen zytotoxischen T-Zellen

Aus den expandierten polyklonalen CTL- Kulturen wurden Zelllinien durch limitierte Verdünnung angelegt. Es wurden  $10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $10^3$  bzw.  $5 \times 10^2$  CTLs pro well in je eine 24-well-Platte gegeben und wöchentlich mit je  $10^5$  peptidbeladenen Milzzellen restimuliert.

#### 2.2.4.3 Zytotoxischer T Zell Assay

Mit Hilfe des zytotoxischen T Zell Assays lässt sich eine Aussage darüber gewinnen, wie effizient die spezifischen zytotoxischen T- Lymphozyten bestimmte Zielzellen erkennen und lysieren. Das Prinzip des *chromium release assays* besteht darin, dass die mit radioaktivem Chrom markierten Zielzellen durch die spezifischen T- Zellen lysiert werden, die Radioaktivität in das Medium freigesetzt wird und im Zellüberstand gemessen werden kann. Die prozentuale spezifische Lyse berechnet sich wie folgt:

$$100\% \times [(spezifische Lyse - spontane Lyse) / (maximale Lyse - spontane Lyse)] \\ = \% \text{ spezifische Lyse}$$

Der Wert der maximalen Lyse ist die freigesetzte Radioaktivität nach 100%iger Lyse der markierten Zellen in Anwesenheit von 1% Triton X im Medium. Der Wert der spontanen Lyse ist die freigesetzte Radioaktivität ins Medium in Abwesenheit zytotoxischer T-Zellen.

#### Durchführung:

$2 \times 10^5$  Zielzellen (P815) wurden in 100µl Medium mit 50 µCi radioaktivem Chrom 2h bei 37°C inkubiert. Für die Kontrolle der zytotoxischen Aktivität der T-Zellen wurden P815 Zellen während dieser Zeit mit und ohne 100nM YPHFMPTNL- Peptid (pp89-Epitop) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit  $2 \times 5$ ml Medium gewaschen (5min, 2000rpm). In einer 96-Loch-Rundbodenplatte wurden jeweils 2000 Zielzellen mit dem Proteasomverdauansatz und den spezifischen T-Zellen z. B. im Verhältnis 1/27, 1/9, 1/3 und 1/1 über 4h bei 37°C inkubiert. Für jeden Messwert wurden Dreifachansätze pipettiert. Nach der vierstündigen Inkubationszeit wurden von den 200µl Medium pro well jeweils 100µl Überstand in Messröhrchen pipettiert und im Gammacounter (Cobra Packard) gemessen.

#### 2.2.4.4 Immunopräzipitation

##### Material:

Normales Kaninchenserum (Dr. J. Pinda Antikörperservice)

Protein A- Sepharose (Pharmacia Biotech), Protein G- Agarose (Boehringer Mannheim), anti pp89-Antikörper b5/4 (Dr. H. Hengel), anti Penta- His- Antikörper (Qiagen), WHATMAN- Papier, Phosphoimager

##### Lösungen:

NET-T: 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris HCl, pH 8.0, 0.5% Triton X-100

NET-TO: 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris HCl, pH 8.0, 0.5% Triton X-100,

1mg/ml Ovalbumin

NET-TON: 500mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris HCl, pH 8.0, 0.5% Triton X-100,  
1mg/ml Ovalbumin

#### Durchführung:

Mit His- getaggttem Ubiquitin transfizierte Zellen wurden nach einem Pulse- Chase mit  $^{35}\text{S}$  Met (vgl. 2.2.3.8) immunopräzipitiert. In einem Vorreinigungsschritt wurde zu 100µl Zelllysat 5µl normales Kaninchenserum gegeben und für 30min unter wiederholtem Vortexen auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 20µl gequollene Protein- A- Sepharose in NET-TO äquiliibriert, zu den Lysaten hinzu pipettiert und für weitere 30min unter wiederholtem Vortexen auf Eis gelagert. Zu diesem von unspezifisch bindenden Proteinen gereinigten Überstand wurde der präzipitierende Antikörper hinzu gegeben (5µl anti-pp89 b5/4 bzw. 3µl anti-Penta-His (0.2µg/µl) bzw. 2µl anti-HA (0.4µg/µl)), und dieser Ansatz auf einem End- zu- End- Schüttler für 16h bei 4°C inkubiert.

Danach wurden 40µl gequollene Protein A- Sepharose/ Protein G- Agarose (Verhältnis 3:1) beigemischt und dieser Ansatz für 1h bei 4°C auf dem Schüttler rotiert. Die Gelsuspension wurde zentrifugiert (2000rpm, 2min), dann 2mal mit 1ml kaltem NET-TON gewaschen und für 20min auf Eis gelagert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Gel in 1ml NET-T aufgenommen, zentrifugiert und wiederholt mit 1ml NET-T gewaschen. Das Gel wurde in 25µl 1 x SDS-Probenpuffer und 5µl β- ME gelöst, für 5min bei 96°C erhitzt und kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 8% Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt und auf WHATMAN- Papier getrocknet. Daraufhin wurden die getrockneten Gele auf Phosphorimagerplatten gelagert, die nach drei Tagen analysiert wurden. Dann wurden Biomax- MR Filme (Kodak) aufgelegt und für 2 bis 3 Wochen bei -70°C aufbewahrt und später entwickelt.

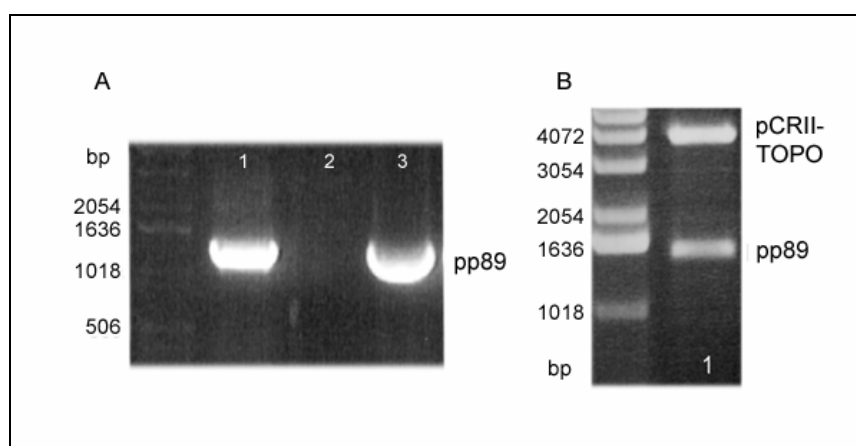
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Abbau und Prozessierung des rekombinanten pp89

##### 3.1.1 Klonierung des rekombinanten pp89

Das pp89 ist das durch differentielles Splicing der (IE1) major immediate- early Region des mCMV hervorgehendes immediate early Protein 1, das durch sein antigenes Potential von besonderem Interesse ist. Der Abbau dieses Proteins durch das 20S Proteasom sollte zunächst *in vitro* analysiert werden, da bisher lediglich unphysiologische Substrate in Form von Peptidfragmenten (25mer) untersucht wurden. Dazu wurde eine Teilsequenz des pp89, die für 484 Aminosäuren kodiert, in den Expressionsvektor pRSET A kloniert. Das resultierende Protein hat ein Molekulargewicht von 55kDa und wird im Folgenden als rek pp89 bezeichnet.

Die verwendeten Primer trugen die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Bam H I (5'-Primer) und Eco R I (3'-Primer). Mittels PCR erfolgte die Amplifikation der cDNA mit den entsprechenden terminalen Schnittstellen. Die PCR- Fragmente wurden anschließend in den pCRII-TOPO-Vektor kloniert. Positive Klone (Insert vorhanden) wurden nach Plasmid-Aufreinigung mittels Restriktionsverdaus mit Bam H I und Eco R I in der DNA-Gelelektrophorese nachgewiesen (Abb. 13). Die isolierte Plasmid- cDNA wurde sequenziert, unter Berücksichtigung der bekannten Nukleotidsequenz erfolgte ein Alignment. Trotz mehrfacher Wiederholungen der PCR und Verwendung von *Pfu* DNA Polymerase konnten zwei Aminosäureaustausche nicht unterbunden werden. Da die Aminosäureaustausche nicht im Bereich des Epitops liegen, wurde mit diesem Konstrukt im Weiteren gearbeitet. Außerdem wurden in der pp89 Sequenz zwei stumme Mutationen nachgewiesen (Abb. 14).



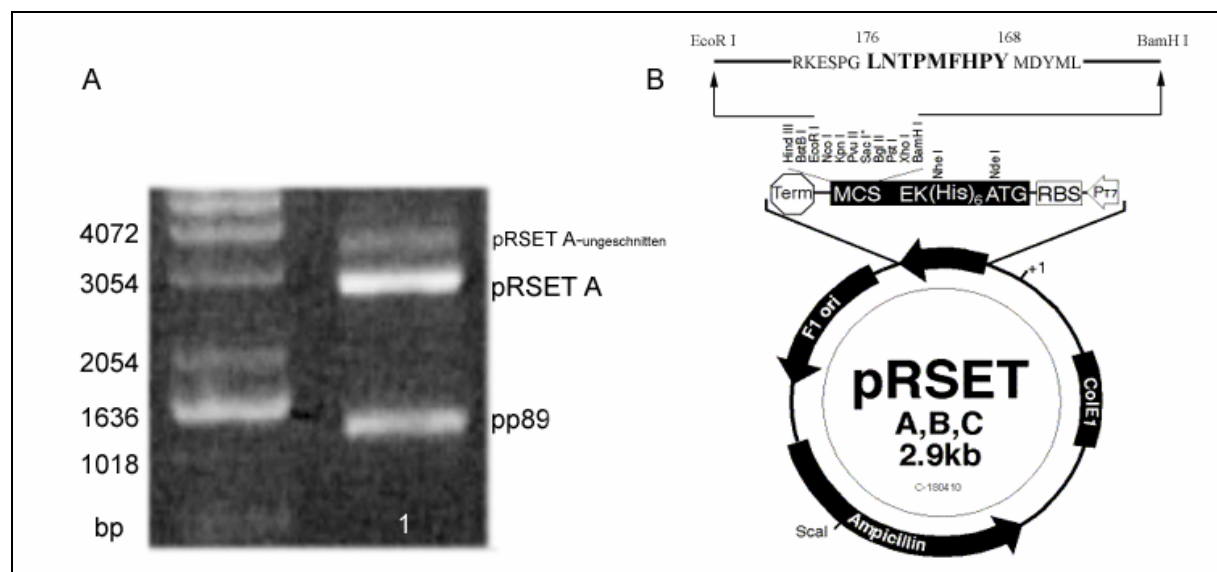
**Abb. 13: PCR des rek pp89 (A) und Restriktionsverdaus (B).** A: Die DNA- Gelelektrophorese zeigt in Spur 1 die Positivkontrolle (pp89 1452bp). Nach PCR mit Bam H I- Forward- und Eco R I- Reverse- Primern Probenaufrufung wie folgt: in Spur 2 der Leerwert, in Spalte 3 das PCR-Produkt rek pp89. B: In Spalte 1 sind das Insert pp89 (1452bp) und der linearisierte TOPO-Vektor (3900bp) dargestellt.

1	31	F	61
MIKQNYQSAINSATNLCQLANDIFERIERQRKMIYGC	SRSEFDNVQLGRLMYDM	<b>YPHFMPTNL</b>	GPSEKRVWMSYVGEAIVAATN
91	121	151	
IDHALDERAAWAKTDCSLPGFEKSEMCVLVGAI RRLHDP	PCYTKPFLDARSQ	LAVWQQMAIESES	VSTHVVVEALKREN
181	211	241	
AVQETIAYEHQYHRVCQMMCNMKDHLETTCLMARGRT	LATLADLRSTRYN	LALFLLSEMHI	FDSFTMPRIRGAMKQ
271	301	E	331
<b>ERTISLAKFRELADRVHNR</b>	<b>SAPSPQGVIEEQQA</b>	<b>EEEEQQQ</b>	<b>QEIEYDPEMPPLER</b>
361	391	421	
<b>EEQVEEPPAD</b>	<b>GEEGGAVGGVT</b>		
<b>QEEPAGEATEEAEDESQ</b>	<b>PGPSDNQVVPESSE</b>	<b>TPTPAEDEETQ</b>	<b>SADEGESQE</b>
451	481		
<b>EGSQQQLILSRPAAP</b>	<b>LDSETDSDSEDD</b>	<b>DEVT</b>	
RIPVGFS	LMTSPVLQPTTRS	SATAAASSGTAP	RPALKRQYAMVHTRSKSENQQPKKSKK"
			" - Stoppcodon

**Abb. 14: Proteinsequenz des rek pp89.** (55kDa, 484 Aminosäuren). Das Epitop ist fett gedruckt und unterstrichen.

Grün markiert sind die laut DNA- Sequenzierung veränderten Aminosäuren, darüber ist jeweils die zu erwartende Aminosäure dargestellt (Position 39: F → S; Position 328: E → G). Die silent mutations sind hingegen fett gedruckt (Position 393: G (ggc→gga); Position 453: P (cct→ccc)). Der Proteinabschnitt von AS 256 - 422 ist kursiv und unterstrichen hervorgehoben und weist auf mögliche PEST-Sequenzen (AS 256-295, AS 293-383, AS 383-405) hin (www.expasy.ch; 15.08.2003).

Das Plasmid mit dem pp89- Insert, das in TOPO10F<sup>-</sup>-Zellen transfiziert wurde (K13), wurde mit Bam H I und Eco R I geschnitten und das Insert in den ausgewählten Expressionsvektor pRSET A, der analog mit den genannten Enzymen geschnitten und anschließend dephosphoryliert wurde, umkloniert. Dieses Plasmid wurde zunächst in ΔDH5α-Zellen transfiziert, folglich amplifiziert und charakterisiert. Anschließend wurde die Plasmid- DNA (rek pp89/pRSET A) für die Proteinexpression in BL21-Zellen transfiziert.



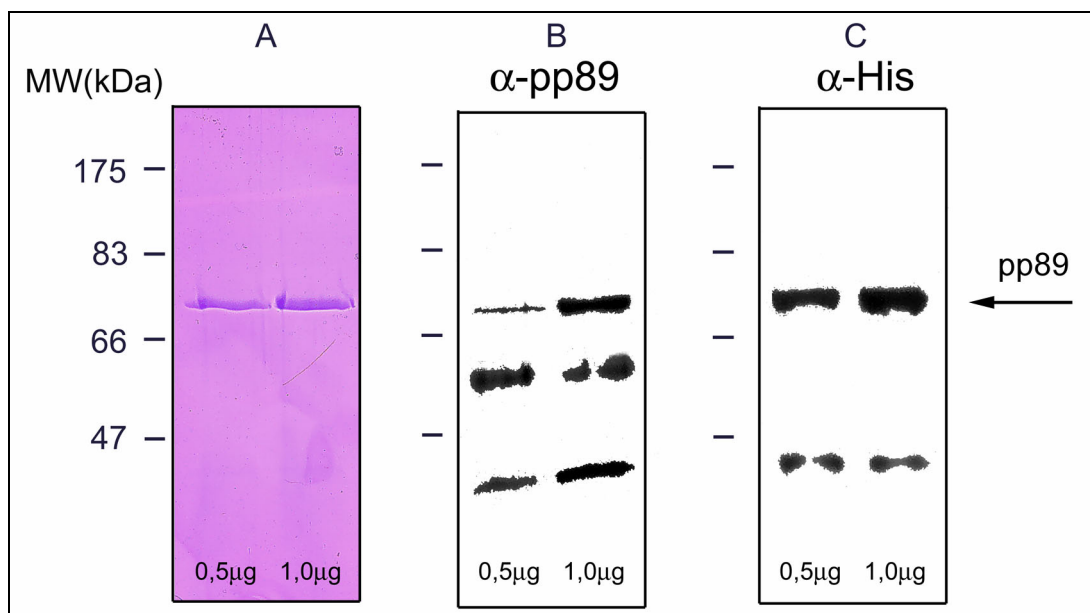
**Abb. 15: pp89 im Expressionsvektor pRSET A.** A: Restriktionsverdau des pp89/ pRSET A mit Bam H I, Eco R I. In Spur 1 ist das geschnittene Insert rek pp89 dargestellt, bei 2.9kb der linearisierte Vektor abgebildet. B: Insertion der pp89-Sequenz in den pRSET A Vektor: Ligation über Bam H I und Eco R I- Schnittstellen. Der Vektor beinhaltet den T7 Promoter, das exprimierte Protein trägt einen N- terminalen His-tag (His)<sub>6</sub>.

### 3.1.2 Expression und Aufreinigung des rekombinanten pp89

Das His- getaggte rekombinante Protein wurde, wie in 2.2.2.8 erläutert, unter Zugabe von Proteaseinhibitoren exprimiert und mit Hilfe von Nickel- NTA- Agarose (Qiagen) aufgereinigt.

In Abb. 16 ist einerseits das gereinigte Protein in der Coomassiefärbung zu sehen, des Weiteren konnte im Westernblot mit  $\alpha$ pp89 b5/1- und  $\alpha$ (RGS)<sub>4</sub>-His- Antikörpern die Identität des Proteins bestätigt werden.

Das Molekulargewicht des aus 484 Aminosäuren bestehenden Proteins ist mit etwa 55kDa kalkuliert worden, wobei unter Einbeziehung des His- tags ungefähr von einem Molekulargewicht von 56kDa auszugehen ist. Aus der Abbildung wird hingegen ersichtlich, dass das Protein in der elektrophoretischen Auftrennung in einem höhermolekularen Bereich nachzuweisen ist (etwa 75kDa). Das Laufverhalten des pp89 änderte sich auch nach nativer Reinigung des Proteins (Imidazolgradient) nicht. Allerdings konnte durch native Reinigungsbedingungen nur eine stark reduzierte Proteinausbeute realisiert werden. Auch die Gelelektrophorese im Tris HCl- gepufferten Harnstoffsystem, das der Bestimmung des Molekulargewichts dienen kann, zeigte kein verändertes Laufverhalten des Proteins. Zur exakten Identifizierung des pp89 wurde die beschriebene Proteinbande isoliert und von Frau Dr. R. Kraft (MDC Berlin) wie folgt analysiert. Nach reduktiver Alkylierung mit Jodacetamid und tryptischem Verdau wurden sowohl ESI-MS/MS- als auch Edman- Sequenzierungen durchgeführt. Die so gewonnenen Peptidfragmente konnten als Teile der Aminosäuresequenz des pp89 zugeordnet werden (vgl. Abb. 17). Ein kopurifiziertes Protein (Laufverhalten bei etwa 55kDa) entspricht einem Elongationsfaktor von *E. coli*.



**Abb. 16: Aufreinigung und Nachweis des pp89.** In der Coomassiefärbung (Abb. A) sind nach SDS- PAGE jeweils 0.5 und 1.0 µg des gereinigten und dialysierten Proteins aufgetragen. Im Westernblot konnte pp89 sowohl mit dem polyklonalen  $\alpha$ pp89- Antikörper (B) als auch mit dem monoklonalen  $\alpha$ His- Antikörper (C) nachgewiesen werden.

1	31	61
MIKQNYQSAINSATNLCQLANDIFERIERQRKMIYGCFRSEFDNVQLGRLMYDMYPHFMPNTNLGPSEKRVWMSYVGEAIVAATNI		
91	121	151
DHALDERAAWAKTDCSLPGFEKSEMCVLVGAIIRLHDPPCYTKPFLDARSQAVWQMKAISESSTHVVVEALKRENLA		
181	211	241
AVQETIAYEHQYHRVCQMMCNMKDHLETTCLARGRTLADLRSTRYNLALFLLSEMHIFFSFTMPRIRGAMKQARCMSYV		
271	301	331
ERTISLAKFRELADRVHNRSAPSPQGVIEEQQAGEEEEQQQEQEIEYDPEMPPLEREEEEEQEDEQVEEEPPADEEEGGAVGGVT		
361	391	421
QEEPAGEATEEEAEDESQPGPSDNQVVPESSETPTPAEDEETQSADEGESQELEGSSQQLILSRPAAPLTDSETDSDSEDDDEV		
451	481	
RIPVGFSLMTSPVLQPTTRSATAAASSGTAPRPALKRQYAMVHTRSKSSENQQQPKKKSKK"		
		" - Stoppcodon

**Abb. 17: Identifizierung der pp89-Aminosäuresequenz mit MS/MS und Edman- Abbau.** Unterstrichen und kursiv sind die im Edman- Abbau bestimmten Peptide gekennzeichnet, grün hingegen die aus der MS/MS gewonnenen Sequenzen.

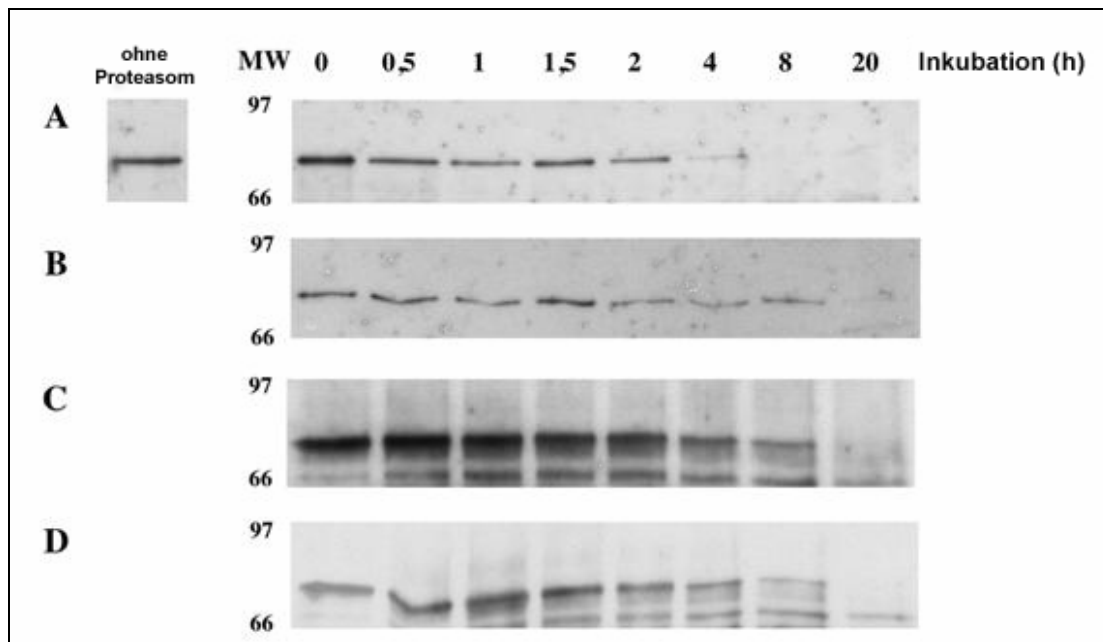
### 3.1.3 *In vitro* Verdau des rekombinanten pp89 durch das Proteasom

In Analysen zur Antigenprozessierung des Proteasoms konnte mit Hilfe synthetischer Polypeptide (das Epitop beinhaltende Sequenzen) gezeigt werden, dass 20S Proteasomen *in vitro* aus 21-40mer Peptiden spezifische Epitope prozessieren können. So konnte unter anderem demonstriert werden, dass 20S Proteasomen in *in vitro* Verdaus aus einem synthetischen epitoptragenden pp89-25mer Peptid das entsprechende 9mer, das korrekte H-2L<sup>d</sup> restringierte Epitop **YPHFMPNTL** mit hoher Präzision generieren (Boes 1994, Dick 1996). Allerdings stellt sich die Frage, ob diese Resultate auch der physiologischen *in vivo* Situation entsprechen. Um diesem Punkt näher zu kommen, wurden sowohl der Abbau des rek pp89 durch das 20S Proteasom als auch der Einfluss von PA28 und des Immunoproteasoms auf diesen Prozess untersucht. Die aus humanen Erythrozytenkonzentraten gewonnenen 20S Proteasomen wurden einerseits mit pp89, andererseits zur Kontrolle der Aktivität des 20S mit dem 25mer **RLMYDMYPHFMPNTLGPSEKRVWMS** (Kloe1) inkubiert (vgl. 2.2.2.17). So konnte der zeitliche Verlauf des Proteinabbaus beobachtet werden. Die Verdauprodukte wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und pp89 im Westernblot analysiert. Die Aktivität des eingesetzten c20S und i20S wurde nach Inkubation mit Kloe 1 in der HPLC analysiert. Es konnte sowohl das charakteristische Peakmuster, das bei den Verdaus entsteht, gezeigt werden als auch der Peak, dessen Retentionszeit dem 9mer zugeordnet werden konnte, nachgewiesen werden (vgl. Abb. 18).

Trotz der nicht erfolgten Verwendung von Detergentien lässt sich in der Coomassiefärbung sowie im Westernblot (pp89) bei Verdau mit dem konstitutiven 20S Proteasom innerhalb von 4 Stunden der nahezu komplette Abbau des rekombinanten, partiell gefalteten pp89 beobachten. Um einen Einfluss von kopurifizierten Proteasen auszuschließen, wurden während der gesamten Isolierung des pp89 Proteinaseinhibitor- Cocktail Complete® (Roche) hinzu gegeben, der ein sehr breites Spektrum proteolytischer Aktivität inhibiert. Der Abbau des Proteins wurde weiterhin in Anwesenheit von PA28 und bei Inkubation mit Immunoproteasomen verfolgt, da in Abhängigkeit davon Aktivitätsänderungen und verschiedene Schnittmuster des 20S beschrieben sind (Dick 1996, Groettrup 1996,



Kuckelkorn 2002). Wie in Abb. 18 C zu sehen ist, bauen Immunoproteasomen das rekombinante Protein wesentlich langsamer ab, nach 8 Stunden ist das Substrat noch, allerdings deutlich vermindert, nachweisbar. PA28 zeigt keinen stimulatorischen Effekt auf den Abbau des pp89, es scheint sogar vielmehr die Effizienz des Substratumsatzes zu beeinträchtigen (vgl. Abb. 18 B/D).



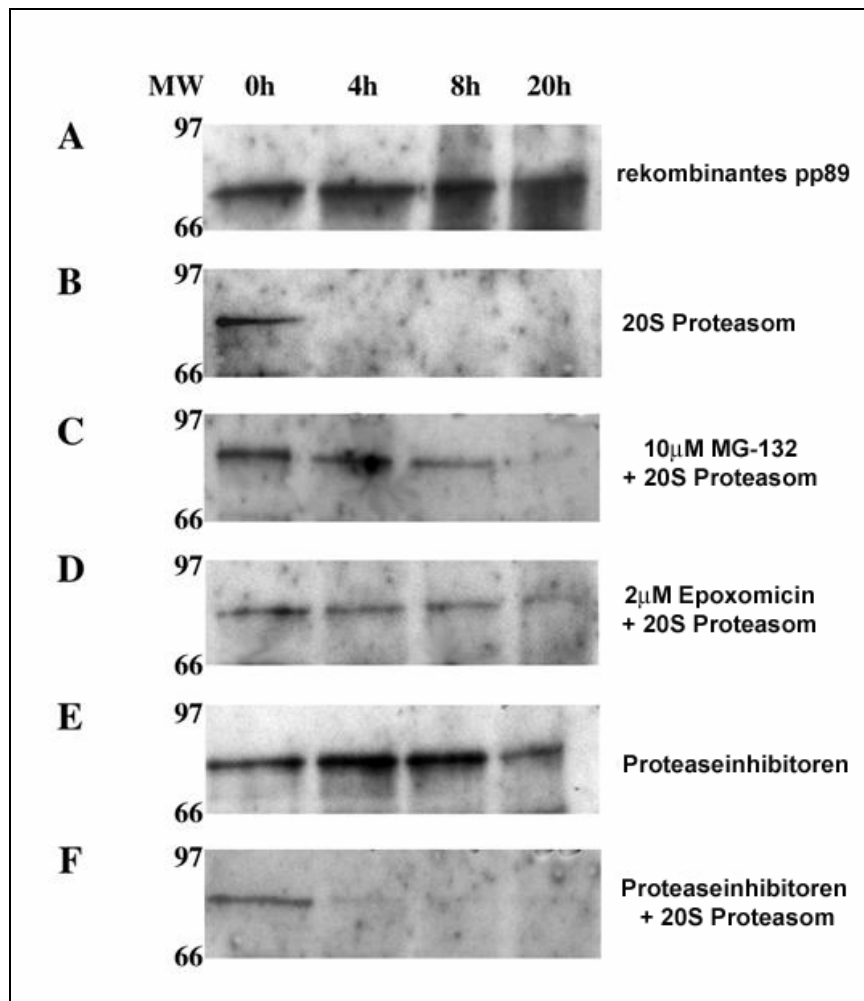
**Abb. 18: *In vitro* Degradation des pp89 durch c20S und i20S in An- bzw. Abwesenheit von PA28.** SDS-PAGE und Westernblot mit  $\alpha$ pp89 b5/1. In Abb. A ist der Abbau des Proteins in Gegenwart von c20S dargestellt, wobei 3  $\mu$ g 20S und 50  $\mu$ g pp89 bei 37°C verdaut und jeweils 50  $\mu$ l Fraktionen mit 1% TFA inaktiviert wurden. Links oben ist der 0h-Wert ohne 20S zum Vergleich aufgetragen. Nach nur 4h zeigt sich ein nahezu vollständiger Abbau des pp89. In Gegenwart von PA28 (18  $\mu$ g) ist der Substratumsatz hingegen vermindert (B). Auch bei Einsatz von Immunoproteasomen (C) wird ein zeitlich verzögerter Abbau des pp89 deutlich, obwohl im Test mit fluorogenen Substraten die Aktivität von c20S und i20S identisch erschien. Bei Gabe von PA28 zum Ansatz mit i20S (D) zeigt sich ein mit C vergleichbarer Proteinumsatz, so dass der Effekt von PA28 auf die Proteindegradation zu diskutieren ist (vgl. 4.1.2).

Wie bereits beschrieben, erfolgte die gesamte Aufreinigung des rekombinanten Proteins unter Zusatz von Proteinaseinhibitoren (Proteinaseinhibitor- Cocktail Complete®), womit die Stabilität des Proteins gewährleistet werden konnte. Um den Einfluss derartiger Proteasen auf den Proteinabbau auch während des Verdaus sicher auszuschließen, wurden diverse Kontrollversuche durchgeführt, in denen sich bei Zugabe von Inhibitoren kein verändertes Verhalten des Proteinabbaus beobachten ließ. Folgende Inhibitoren wurden verwendet: Pepstatin\*, Leupeptin\*, Aprotinin\* (\* inhibieren Aspartat- und Serinproteasen), Bestatin (inhibiert Aminopeptidasen), Trypsininhibitor, PMSF, AAF-CMK (AAF- Carboxymethylketon inhibiert Tripeptidylpeptidase II). In Abb. 19 E/F wird deutlich, dass der Abbau des rekombinanten Proteins eindeutig dem 20S Proteasom zuzuschreiben ist, erst durch Zugabe des c20S erfolgt die Proteindegradation. Wird hingegen lediglich der zeitliche Verlauf des rek pp89 in Abwesenheit jeglicher Proteaseinhibitoren und ohne Zusatz von 20S dargestellt

(Abb. 19 A), zeigt sich während des Beobachtungszeitraumes ein stabiles Protein. Somit kann indirekt ein Vorhandensein bzw. ein Einfluss von kopurifizierten Proteasen ausgeschlossen werden.

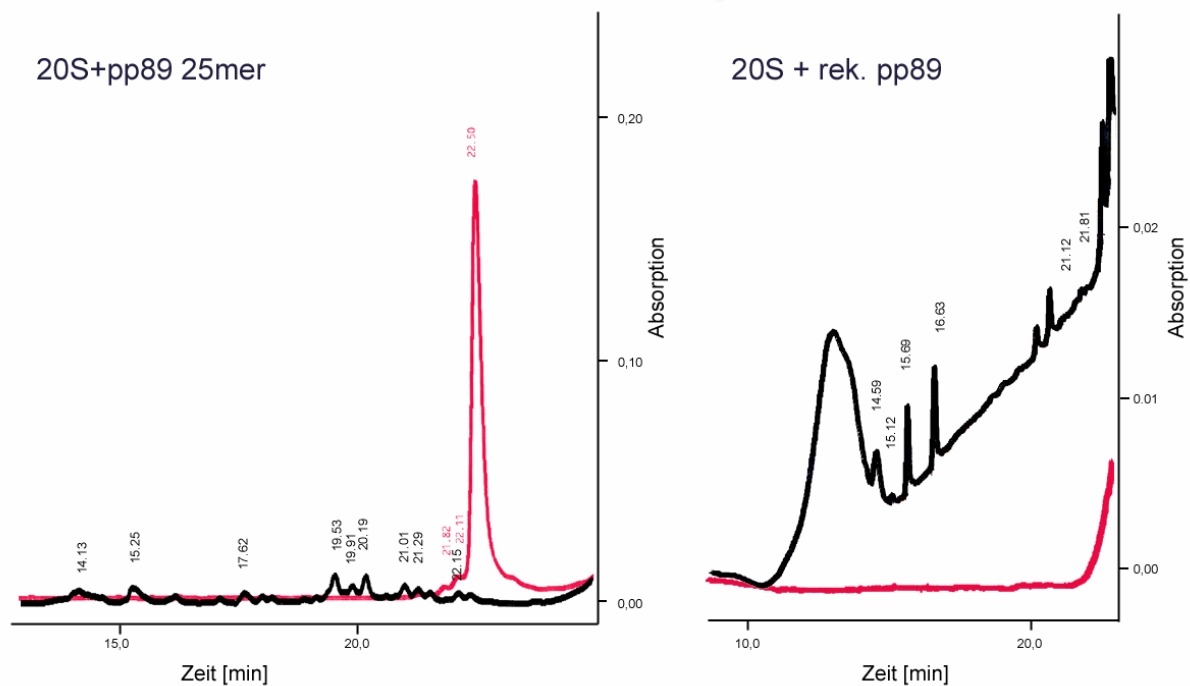
Des Weiteren wurde die Abhängigkeit des Proteinabbaus von charakteristischen Proteasomeninhibitoren veranschaulicht. Sowohl im Falle des reversibel inhibierenden Peptidaldehyds MG132 (Endkonzentration=10 $\mu$ M) als auch nach Zugabe des potenten irreversiblen Inhibitors Epoxomicin (ein Epoxyketon isoliert aus Aktinomyzeten, Endkonzentration=2 $\mu$ M) konnte ein stark verminderter Proteinabbau beobachtet werden (Abb. 19 C/D). Diese Tatsache unterstreicht die bereits postulierte Abhängigkeit der Proteindegradation vom 20S Proteasom.

Die bisher dargelegten Daten sprechen für einen Abbau des rekombinanten pp89 durch das Proteasom. Diese Annahme wurde in weiteren Experimenten bekräftigt. Das Interesse richtete sich dabei insbesondere auf den Nachweis prozessierter Peptidfragmente, wie sie einerseits in der RP-HPLC nachgewiesen werden können und sich in der ESI- MS/MS spezifischen Aminosäuresequenzen zuordnen lassen. Zunächst wurden die einzelnen Verdaufractionen (Kloe1 und rek pp89 jeweils als Substrat) über ein HPLC System (siehe 2.2.2.19) mittels Wasser/ Acetonitrilgradienten getrennt und die Peakmuster der 0- und 20-Stundenverdaus verglichen. Da das pp89 Epitop YPHFMPTNL nur einen geringen Prozentsatz der Abbauprodukte darstellt, konnte ein sicher zuzuordnender Peptidpeak nicht gefunden werden (Dick 1996). Demnach kann mit diesem analytischen Verfahren kein konkreter Anhaltspunkt für die Generierung des Epitops bzw. von Epitop-Precursorfragmenten gefunden werden. Allerdings lassen sich im Vergleich mit dem 0-Stundenwert einzelne Peptidpeaks nachweisen, die aus dem Abbau des pp89 resultieren (Abb. 20).



**Abb. 19: *In vitro* Abbau des rekombinanten pp89 durch das c20S Proteasom.** Auftrennung in 12,5% Acrylamidgelen mittels SDS-PAGE, Westernblot mit app89 b5/1 und ECL. In Abb. A (ohne Proteasom) und B wird deutlich, dass der Abbau des Proteins dem c20S unterliegt. In Anwesenheit des Proteasoms ist pp89 bereits nach 4h im Westernblot nicht mehr nachweisbar. Dies wird durch den inhibitorischen Effekt von MG132 und Epoxomicin, einem sehr spezifischen Hemmstoff des Proteasoms, auf die Degradation bestätigt (Abb. C/D). Der Zusatz verschiedener Proteaseinhibitoren zeigt keinen Effekt auf den Abbau, das Protein ist unter diesen Bedingungen stabil und wird bei Zugabe von c20S, ähnlich wie in Abb. B zu sehen, proteasomabhängig abgebaut und ist nach 4h nicht mehr nachweisbar.

In weiteren Experimenten wurden die einzelnen HPLC- Fraktionen einer Analyse durch die ESI- MS/MS unterzogen. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise von Frau Dr. K. Janek (Institut für Biochemie, Charité Berlin) durchgeführt. Auch in der Auswertung der ermittelten Daten war das zuvor erwähnte Problem hinsichtlich der geringen Menge und großen Vielzahl der generierten Fragmente des Proteins deutlich, es ließen sich keine konkreten Peptidsequenzen identifizieren. Deshalb stellte sich die Frage nach einem alternativen Analytikverfahren, um die Prozessierung des rek pp89 durch das Proteasom und insbesondere die Generierung des 9mer Epitops in diesem Zusammenhang zu charakterisieren.

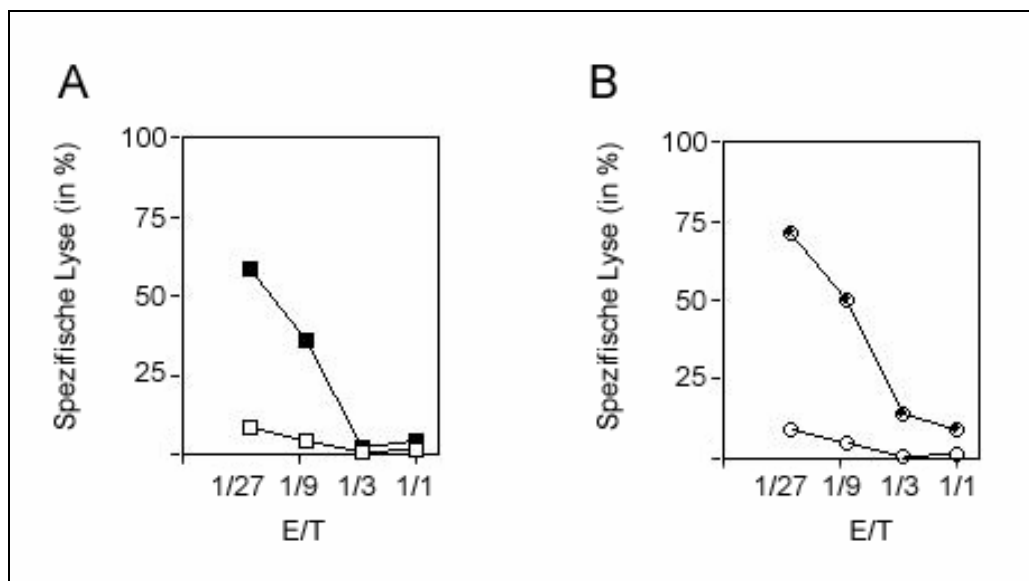


**Abb. 20: RP-HPLC der Peptid- bzw. Proteinverdau mit dem c20S Proteasom.** Dargestellt sind zwei Chromatogramme, der 0-Stundenverdau entspricht dem roten Graphen, der 20-Stundenverdau dem schwarz gezeichneten. Links gezeigt ist der Verdau des pp89 25mers Kloe 1 (RLMYDMYPHFMPTNLGPSEKRVWMS). Bei 22.5min findet sich der Peak des 25mer und ist nach Verdau durch 20S nicht mehr nachweisbar, hingegen sind viele einzelne Peaks zu erkennen, die der prozessiven Aktivität des 20S Rechnung tragen. In der rechten Abb. wiederum kommen die Chromatogramme eines pp89 Verdau zur Darstellung, das Laufverhalten ist uncharakteristisch. Nach 20 Stunden sind einzelne Peptidpeaks, die aus dem Abbau des rek 20S resultieren, zu sehen.

Ein sehr sensitives Verfahren stellt der CTL- Assay dar, der mittels spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) eine selektive Erkennung des Epitops des pp89 (YPHFMPTNL) erlaubt. Als antigenpräsentierende Zellen (so genannte Targetzellen) fungierten murine P815 Mastozytomazellen, die zunächst mit  $^{51}\text{Cr}$  markiert und dann von außen mit dem Verdauansatz beladen wurden. Von spezifischen CTLs erkannte Mastozytomazellen wurden lysiert, setzten  $^{51}\text{Cr}$  frei. Die Zellyserate ist ein Maß dafür, ob und wie viele der Targetzellen durch die CTLs erkannt werden. An dieser Stelle sei Frau Dr. U. Salzmann (ehemals Institut für Biochemie, Charité Berlin) sehr herzlich gedankt. Sie hat die CTLs generiert und stand bei den Experimenten unterstützend zur Seite.

Wie in Abb. 21 ersichtlich ist, führt die Beladung von P815-Zellen mit den vom c20S generierten Peptiden (Verdauansatz: pp89 + c20S nach 20h Inkubation) zu einer spezifischen Lyse dieser Targetzellen durch die für das pp89 Epitop spezifischen zytotoxischen T- Lymphozyten (A). Daher kann zusammenfassend aus den unter 3.1 dargestellten Daten geschlussfolgert werden, dass konstitutive 20S Proteasomen große, nur partiell gefaltete Proteine abbauen können. Sie können das gleiche Epitop generieren, das während des Abbaus des synthetischen pp89 25mers entsteht oder wie es in Zellkulturen

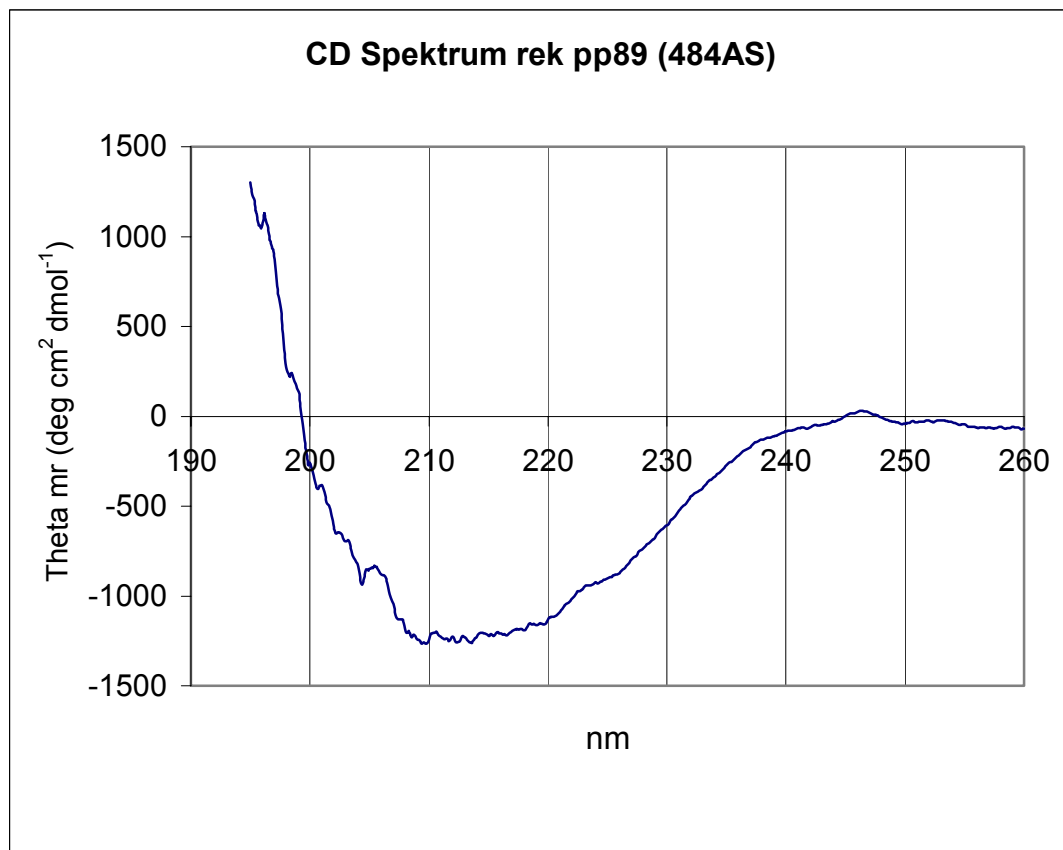
von mit pp89 transfizierten Mausfibroblasten (B8-Zellen) nachgewiesen wurde (Eggers 1995, del Val 1989).



**Abb. 21: Detektion des H-2L<sup>d</sup> restringierten pp89 Epitops YPHFMPTNL im CTL Assay.** A: P815-Zellen (murine Mastozytomazellen) wurden mit <sup>51</sup>Cr markiert und im Anschluss für 4 Stunden mit dem Verdauansatz (20h) des pp89 und des c20S (schwarze Quadrate) inkubiert. Die leeren Quadrate symbolisieren den Nullstundenwert des Verdauansatzes. B: Als Kontrollpeptid fungierte das synthetische 9mer YPHFMPTNL (schwarze Kreise), es wurde ebenfalls über 4 Stunden mit P815-Zellen inkubiert. Die Lyse von P815-Zellen ohne Peptidzusatz ist mit leeren Kreisen dargestellt. Die Lyserate wurde anhand der <sup>51</sup>Cr Freisetzung ermittelt.

### 3.1.4 CD- Spektrum des rekombinanten pp89

Das isolierte rekombinante pp89 (vgl. 2.2.2.8) wurde unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und in weiteren Schritten gegen einen Puffer (0.5M Harnstoff, 0.01M Tris HCl, pH 7.5) dialysiert und in dieser Form in den Verdaus eingesetzt. Bei einer Harnstoffkonzentration von 0.5M kann bereits von einer partiellen Rückfaltung des Proteins ausgegangen werden. Um diese Vermutung mit experimentellen Daten zu untermauern, wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. M. Dathe und Frau H. Nikolenko (FMP Berlin- Buch) ein CD- Spektrum des Proteins aufgenommen. Da Harnstoff das Absorptionsverhalten während der Messung stark beeinträchtigt, wurde das Protein erneut gegen ein Tris- Puffer- System (0.01M Tris HCl pH 7.5) dialysiert und das entsprechende Spektrum aufgenommen. Das Spektrogramm wies eine deutliche Überlagerung verschiedener Sekundärstrukturen auf, wobei jedoch aufgrund charakteristischer Bandenmuster auf das Vorliegen zahlreicher  $\beta$ -Faltblätter und damit einer partiellen Faltung geschlossen werden konnte.



**Abb. 22: CD Spektrum des rekombinanten pp89.** Das im Bereich von 195-260nm gewonnene Spektrum zeigt eine Überlagerung verschiedener Sekundärstrukturen, die mit Hilfe eines Dekonvolutionsprogramms quantitativ bestimmt wurden (vgl. Tab. 3).

Mit Hilfe eines Dekonvolutionsprogramms konnte unter Berücksichtigung der Aminosäuren des Proteins die prozentuale Verteilung der einzelnen Sekundärstrukturen ermittelt werden (vgl. Tab. 3), wobei über das gesamte Spektrum antiparallele  $\beta$ -Faltblätter dominieren. Alle anderen möglichen Sekundärstrukturelemente sind jedoch auch vorhanden. Etwa 35% der Sekundärstrukturen werden der Gruppe ungeordneter Strukturen (random coil) zugerechnet, die auf partiell entfaltete Sequenzbereiche innerhalb des pp89 hindeuten. Insgesamt stellt sich das rekombinante Protein somit als partiell gefaltetes Protein dar, das vom 20S Kernkomplex in dieser Form degradiert wird. Ein Einfluss des restlichen Harnstoffs (0.5M in Dialysepuffer 1) auf die Rückfaltung konnte primär nicht ausgeschlossen werden. Kontrollverdaus mit dem gegen Puffer 2 (0.01M Tris HCl pH 7.5) dialysiertem Protein zeigten jedoch ein annähernd identisches kinetisches Verhalten wie in Abb. 21 A dargestellt. Somit ist der Effekt der restlichen Harnstoffkonzentration von 0.5M auf die Sekundärstruktur als minimal anzusehen, insbesondere scheint er ohne Auswirkung auf den proteasomalen Abbau des rek pp89 zu sein.

	Wellenlänge $\lambda$	$\lambda$	$\lambda$	$\lambda$	Durchschnittswert
Sekundärstruktur	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm	
$\alpha$ - Helix	8,20%	7,30%	4,40%	4,70%	6,15%
$\beta$ - Antiparallel	40,10%	39,70%	41,40%	42,70%	40,98%
$\beta$ - Parallel	5,40%	5,60%	5,30%	5,30%	5,40%
$\beta$ - Turn	18,60%	19,50%	19,20%	19,40%	19,18%
random coil	32,70%	36,30%	35,00%	35,30%	34,82%
totale Summe	105,10%	108,50%	105,40%	107,40%	

**Tab. 3: CD- Dekonvolution: pp89 Sekundärstruktur.** Die Berechnung der prozentualen Verteilung der einzelnen Anteile von Sekundärstrukturformen zeigt, dass das rekombinante Protein in einer partiell gefalteten Form (etwa 65% geordnete Struktur) vorliegt, 35% der Proteinsequenz liegen nicht gefaltet im Sinne denaturierter Abschnitte vor.

### 3.2 Polyubiquitinierung des pp89 Abbaus durch das 26S Proteasom *in vivo*

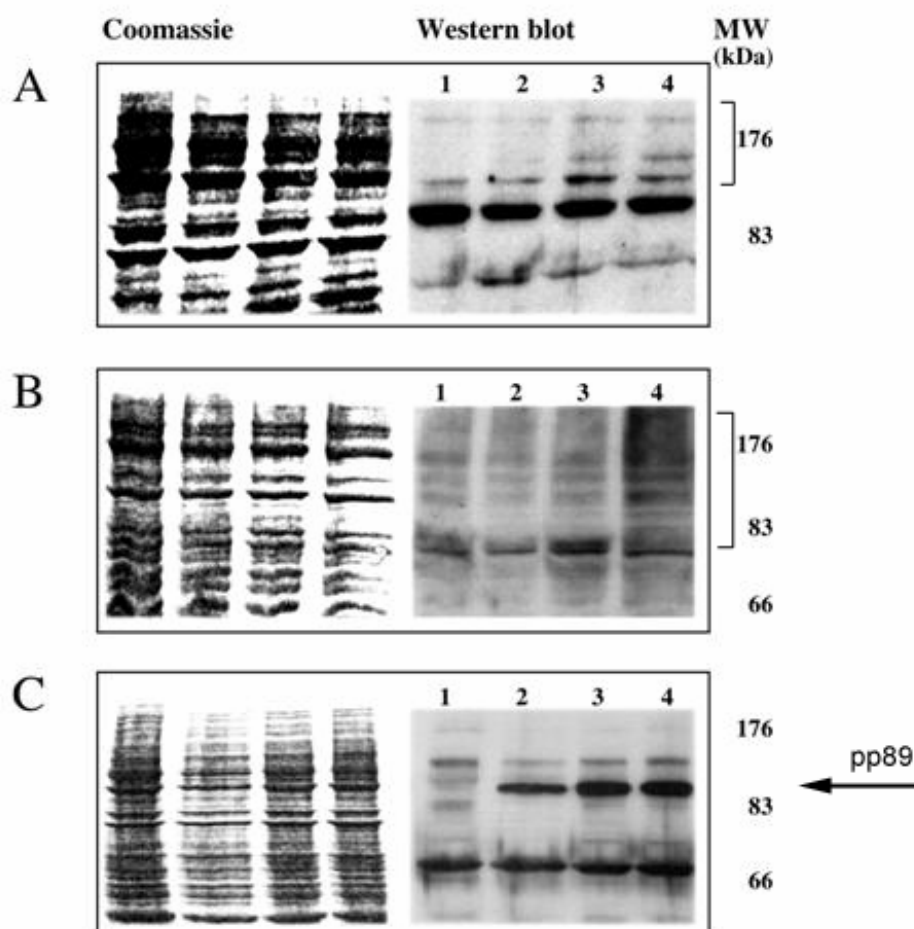
In 3.1 wurde die Fähigkeit des 20S Proteasoms, aus dem partiell gefalteten pp89 das entsprechende antigene Peptid YPHFMPTNL bzw. den Precursor *in vitro* zu generieren, ausführlich dargelegt. Diese Erkenntnis und die Tatsache, dass die Präsentation dieses viralen MHC Klasse I- Epitops *in vivo* vom Proteasom abhängig ist, implizieren gleichzeitig die Frage, ob der proteasomale intrazelluläre Abbau dieses viralen Proteins einer intrazellulären Polyubiquitinierung bedarf. Wie bereits unter 1.1.5 detailliert erläutert, unterliegen viele Proteine einer Polyubiquitinierung und werden danach durch das 26S Proteasom erkannt und abgebaut. In den folgenden Experimenten wurde zur Analyse einer potentiellen Polyubiquitinierung die murine Fibroblastenzelllinie B8 verwandt, die durch eine stabile Transfektion mit pp89 in C4 Zellen generiert wurde (Boes 1994).

#### 3.2.1 Transiente Transfektion von HA- bzw. His- markiertem Ubiquitin in B8 Zellen

C4 und B8 Zelllysate wurden zunächst im Westernblot mit Ubiquitin-, pp89- und HA-Antikörpern analysiert, wobei einerseits das pp89 in den B8 Zellen (mit pp89 cDNA stabil transfizierte Zellen) nachgewiesen werden konnte (Abb. 23), sich jedoch unter selben Bedingungen kein Hinweis auf eine Ubiquitinierung in Form höhermolekularer Proteinbanden zeigte (Abb. 23 B, C, Spur 2). Um eine Limitierung des Ubiquitins auszuschließen, wurden die B8 Zellen transient mit HA- bzw. His- getagtem Ubiquitin (HA- bzw. His- Ubi Plasmide, Abb. 24) transfiziert. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 48 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurden 2 Stunden vor der Ernte der Zellen jeweils 6  $\mu$ M MG132 (respektive als Kontrolle die volumenäquivalente Menge DMSO) als spezifischer Proteasomeninhibitor zu den Zellen gegeben. Nach der Transfektion von HA- Ubiquitin konnten in den Westernblots vermehrt polyubiquitinierte Substrate sowohl mit dem Ubiquitin- Antikörper (Abb. 23 B, Spur 3) als auch mit dem monoklonalen HA- Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 23 A, Spur 3). Im Gegensatz dazu wurde mit dem pp89- Antikörper kein polyubiquitiniertes pp89 detektiert (Abb. 23 C, Spur 3). Obwohl eine quantitativ ausreichende Menge an freiem

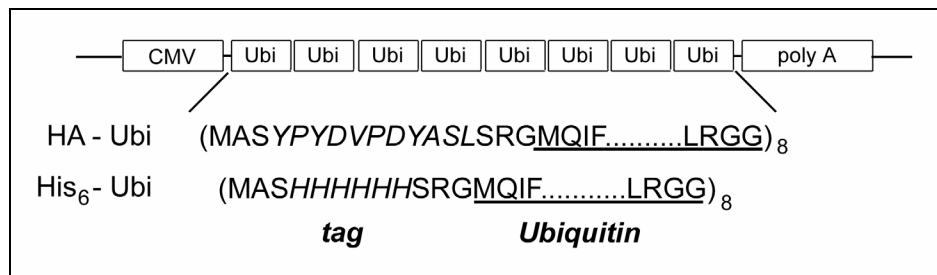
intrazellulären Ubiquitin angenommen werden kann, findet sich in diesem Experiment kein Hinweis auf eine Ubiquitinierung des viralen Substrats pp89.

Der inhibierende Effekt des MG132 auf das Proteasom spiegelt sich in der quantitativen Zunahme der polyubiquitinierten Substrate wider, die insbesondere mit dem Ubiquitin-Antikörper, der sowohl endogen als auch transfiziertes Ubiquitin nachweist, deutlich werden (Abb. 23 B, Spur 4). Allerdings führte die Inhibition der Proteasomen ebenfalls zu keinem Nachweis von ubiquitiniertem pp89 (Abb. 23 C, Spur 4). Somit ergab sich aus diesem Experiment kein Hinweis auf eine Ubiquitinierung des viralen Proteins.



**Abb. 23: Detektion von pp89 und Ubiquitin aus Zelllysaten im Westernblot.** Murine Fibroblasten (C4 Zellen, jeweils Spur 1) wurden mit einem pp89 Konstrukt stabil transfiziert (B8 Zellen, jeweils Spur 2). Zellkulturen der B8 Zellen wurden transient (Kalziumphosphat- Transfektion) mit HA- markiertem Ubiquitin transfiziert. Die Inkubation erfolgte einerseits ohne MG132 (Spur 3, stattdessen DMSO- Kontrolle), in Spur 4 sind die Lysate dargestellt 2 Stunden nach Zugabe von 6µM MG132. Im linken Teil der Abb. sind die zugehörigen Blots (Immobilon®) nach Färbung mit Coomassie zu sehen, um die Äquivalenz der aufgetragenen Proteinmengen zu belegen (Proteinbestimmung nach Bradford). Abb. A: αHA- Antikörper; Abb. B: αUbiquitin- Antikörper; Abb. C: αpp89- Antikörper. Die am rechten Bildrand dargestellten Klammern deuten auf die polyubiquitinierten Produkte hin.

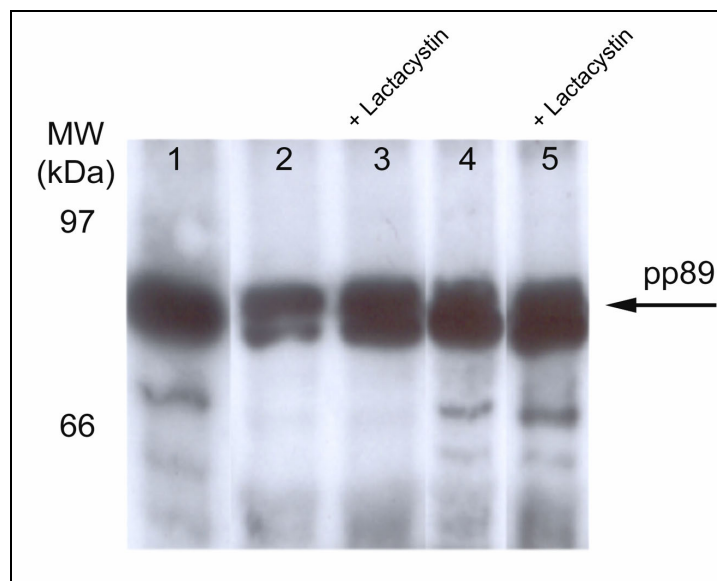




**Abb. 24: Struktur der Vektoren, die markiertes Ubiquitin exprimieren.** Die Vektoren bestehen aus der CMV Promoter/Enhancer Region, die die Transkription der mRNA initiiert. Diese mRNA kodiert ein Molekül aus 8 N-terminal markierten (HA-tag bzw. His-tag) Ubiquitineinheiten. Die Proteinsequenzen des His<sub>6</sub>- und des HA-markierten Ubiquitins sind im unteren Abschnitt der Abbildung dargestellt (Treier 1994).

Parallel wurde die Polyubiquitinierung des viralen pp89 in einem ähnlichen Experiment untersucht, wobei murine B8 Zellen mit His-markiertem Ubiquitin (His<sub>6</sub>-Ubi) transient transfiziert wurden. Neben dem Ubiquitin-Plasmid wurden zusätzlich pp89 und  $\beta$ -Catenin cDNA cotransfiziert. Für  $\beta$ -Catenin, das im Zusammenhang mit der malignen Transformation kolorektaler Mukosa steht, ist ein ubiquitinabhängiger Abbauweg durch das 26S Proteasom bekannt (Hochstrasser 1996, Herskho 1998). Damit wäre eine Akkumulation von His-Ubi-markierten Proteinen in der Zelle zu erwarten gewesen. Auch in diesem Experiment wurde das proteasomale System inhibiert, in diesem Falle wurden 10  $\mu$ M Lactacystin eingesetzt. Die ubiquitinierten Proteine sollten mit dem His-tag über das exprimierte Ubiquitin-Plasmid versehen sein. Nach Lyse der Zellen können die His-Proteine mittels Ni-NTA-Agarose isoliert werden. Die an Ni-Agarose gebundenen Proteine werden dann mittels eines imidazolhaltigen Puffers von der Ni-Agarose eluiert, die desorbierten Proteine mit TCA gefällt und in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der folgende Westernblot mit dem polyklonalen  $\alpha$ pp89-Antikörper (Abb. 25) zeigt in allen Spuren das virale Protein mit dem korrekten Molekulargewicht von 89kDa, unabhängig von der Transfektion mit His-markiertem Ubiquitin oder kotransfiziertem His-Ubi, pp89 und  $\beta$ -Catenin. Möglicherweise bindet das virale Protein unspezifisch an Nickelagarose und ein spezifischer Nachweis von geringen Mengen an His-markiertem Protein ist somit nicht möglich. Es stellte sich die Frage, ob das pp89 ein besonders histidinreiches Protein ist. Laut Sequenzanalyse beinhaltet das Protein 25 Histidine bei einer Gesamtzahl von 669 Aminosäuren, was einen prozentualen Anteil von 3,7% darstellt. Dies ist nicht als besonders histidinreich zu werten. Cluster von Histidinen, die eine Bindung an Ni-NTA bewirken, bestehen nicht. Über die Proteinstruktur, die ebenfalls ein derartig spezifisches Bindungsverhalten von pp89 gegenüber Ni-NTA-Agarose erklären könnte, ist nichts bekannt. Auffallend ist jedoch der hohe Anteil an Glutamatresten (9,6%) innerhalb des Proteins, der theoretisch berechnete isoelektrische Punkt des vollständigen Phosphoproteins liegt bei 4.53. Dies könnte eine unspezifische Bindung an die positiv geladene Ni-Agarose erklären.

In den entsprechenden Auftragungen in der SDS-PAGE (Abb. 25, Spur 2-5) waren keine Proteinleitern im Sinne polyubiquitiniertes Substrate auszumachen. Auch in diesem Experiment konnte der inhibitorische Effekt des Lactacystins auf die proteasomale Degradation beobachtet werden: im Vergleich zu den Lysaten ohne Zusatz des Inhibitors (Abb. 25, Spur 2 und 4) akkumulieren nach Zugabe von Lactacystin jeweils mehr Substrate (Abb. 25, Spur 3 und 5). Zusammenfassend betrachtet ließ sich auch in diesem experimentellen Ansatz der Nachweis eines ubiquitinabhängigen Abbaus des viralen Proteins pp89 nicht zeigen.



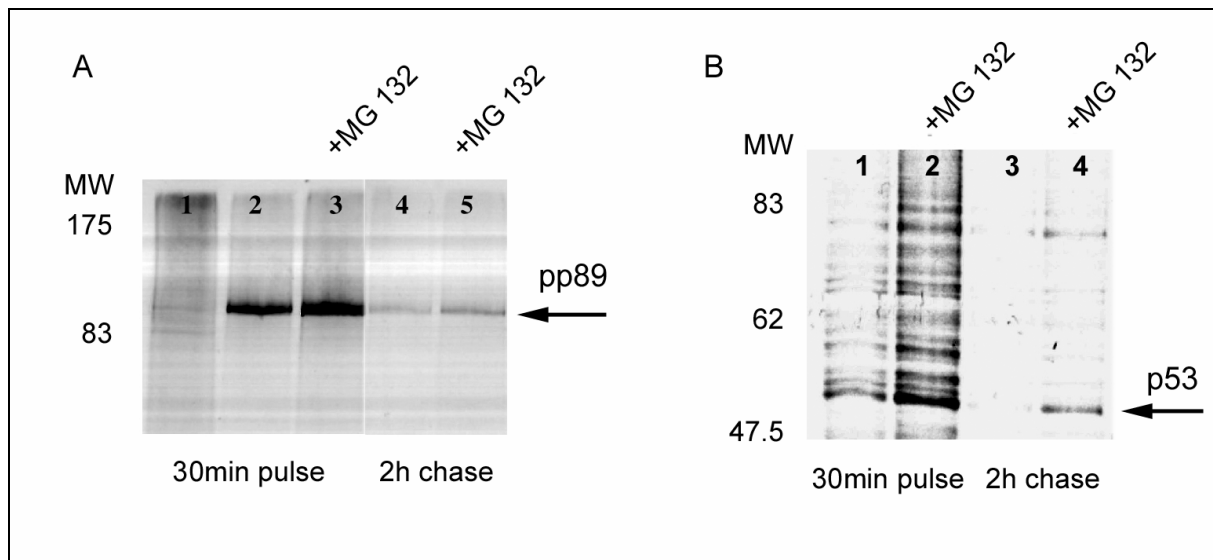
**Abb. 25: Isolation von His- markierten Proteinen aus B8 Zellen.** B8 Zellen (Spur 1) wurden einerseits mit His- Ubiquitin (His<sub>6</sub>- Ubi) transient transfiziert, zum anderen wurde pp89- und  $\beta$ - Catenin- cDNA (Spur 4 und 5) kotransfiziert. Zudem wurde das Proteasomsystem mit 10  $\mu$ M Lactacystin inhibiert (Spur 3 und 5), als Kontrolle diente DMSO (Spur 2 und 4). Die Zelllysate (Lyse in 8M Harnstoffpuffer) wurden an Ni- NTA- Agarose gebunden, mittels Imidazol- haltigem Puffer erfolgte die Isolation der an Ni- NTA- Agarose gebundenen, histidinreichen Proteine. Anschließend TCA- Fällung und Auftrennung der Eluate in 12,5%- igen Acrylamidgelen (SDS-PAGE). Blotting auf Immobilon® und Westernblot mit app89.

### 3.2.2 Immunopräzipitation von pp89

Da aus den bisher dargestellten Versuchen keine Ubiquitinierung des viralen pp89 nachgewiesen werden konnte, wurde im folgenden Experiment versucht, die Empfindlichkeit der Detektion ubiquitiniertes Substrate durch die metabolische Markierung der murinen Fibroblasten mit <sup>35</sup>S Methionin / Zystein zu erhöhen. Im Anschluss an die 30minütige Inkubation mit den radioaktiv markierten Aminosäuren und konsekutiver Zugabe des Standardmediums wurden die Zellen zunächst nach einer Zeitspanne von zwei Stunden geerntet. Zum Vergleich wurde erneut das proteasomale System der Fibroblasten für 2 Stunden mit 10  $\mu$ M MG132 inhibiert, um eine Akkumulation eventuell ubiquitiniertes Substrate zu erreichen. Aus den Zelllysaten wurde mit dem polyklonalen Antikörper app89 b5/4 immunopräzipitiert. Die pp89- IgG- Komplexe wurden mittels Protein A- Sepharose präzipitiert und nach Solubilisierung elektrophoretisch in 8%igen Polyacrylamidgelen

aufgetrennt. Nach Trocknung der Gele wurden die mit pp89 Antikörpern präzipitierten Proteine mit dem Phosphorimager bzw. nach Inkubation auf Filmmaterial (Biomax-MR (Kodak)) visualisiert. Unmittelbar nach der radioaktiven Markierung (Abb. 26 A Spur 2 und 3) ist das virale Protein in seiner gesamten Länge (MW 89kDa) in für die Detektion ausreichender Menge synthetisiert. Im Vergleich dazu sind in Spur 1 derselben Abbildung Lysate von C4 Zellen verwandt worden, die das pp89 nicht exprimieren. Auch in diesem Experiment konnte kein Nachweis einer Ubiquitinierung des pp89 Proteins erbracht werden. Höhermolekulare Proteine, die, wie für das p53 (Abb. 26B) gezeigt, das Resultat einer Polyubiquitinierung wären, waren nicht nachweisbar. Sogar die zeitgleiche Gabe des proteasomspezifischen Hemmstoffs MG132 zeigte keinen Effekt hinsichtlich einer Akkumulation von potentiell ubiquitiniertem pp89, so dass auch hier keine Anzeichen für eine ubiquitinabhängige Degradation des viralen Proteins offenbar wurden.

In einem Versuchsansatz wurde p53 als Positivkontrolle immunopräzipitiert. Wie bereits in 1.1.5 beschrieben, erfolgt der Abbau dieses Tumorsuppressors Ubiquitin- abhängig durch das 26 S Proteasom (Scheffner 1990). In Abb. 26 B erkennt man sowohl das markierte Protein bei etwa 53kDa nach 30minütiger Inkubation als auch höhermolekulare Proteine, die durch den monoklonalen Antikörper präzipitiert werden und die polyubiquitiniertem p53 entsprechen. Bereits während der 30minütigen Markierung ist der Effekt des Proteasomeninhibitors MG132 deutlich, die Hemmung des Proteasoms hat die erwartete Akkumulation ubiquitinitierter Substrate zur Folge (Spur 2). Ein ähnlicher Verlauf ist auch nach 2stündiger Inkubation der Zellen im Standardmedium zu beobachten, lediglich ist insgesamt eine Abnahme der Proteinkonzentration zu verzeichnen (Abb. 26 B Spur 3 und 4), was durch die kurze Halbwertszeit von p53 zu erwarten war.

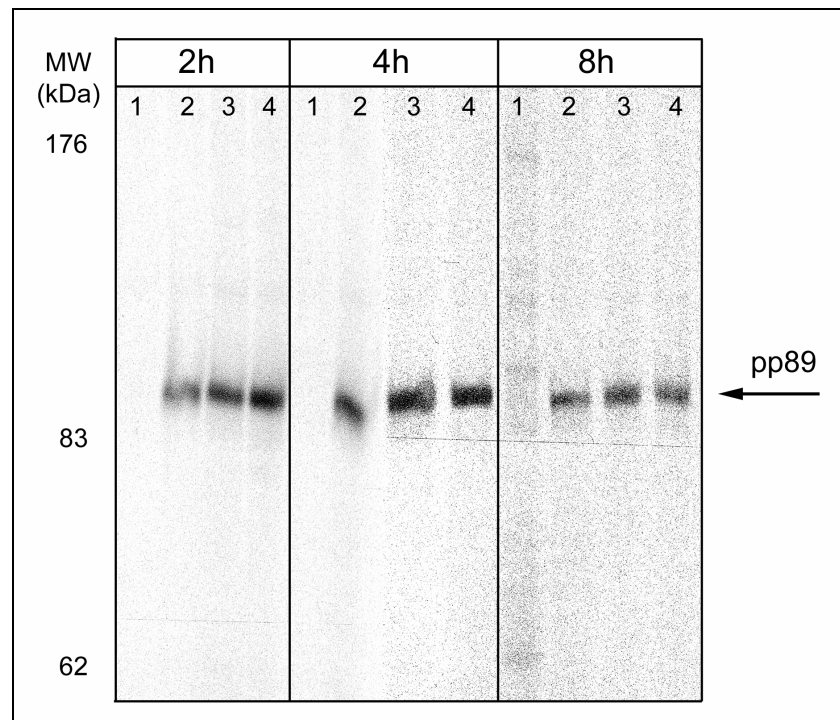


**Abb. 26: Immunopräzipitation von pp89 aus B8 Zellen**, als Kontrolle Immunopräzipitation des ubiquitinabhängigen Transkriptionsfaktors p53. A: C4 (Spur 1) und B8 Zellen (Spuren 2 bis 5) wurden über 30min mit  $^{35}\text{S}$  Methionin markiert (pulse) und nach 2 Stunden Inkubation geerntet (chase). Das proteasomale System der B8 Zellen wurde gleichzeitig mit  $10\mu\text{M}$  MG132 (Spuren 3 und 5) inhibiert. Im Anschluss an die Lyse der Zellen erfolgte die Immunopräzipitation mit  $\alpha\text{pp89}$ - Antikörpern, eine Auftrennung durch SDS- PAGE und Exposition des getrockneten Gels auf einem Röntgenfilm. In einem parallelen Ansatz wurde das Zelllysate mit einem monoklonalen  $\alpha\text{p53}$ - Antikörper präzipitiert. Dieses Kontrollexperiment zeigt unter selbigen Versuchsbedingungen die Polyubiquitinierung des Substrats und den durch MG132 inhibierten Abbau des Proteins infolge Hemmung des Proteasoms (Daten aus experimenteller Zusammenarbeit mit Frau Dr. U. Kuckelkorn).

Aus dem beschriebenen Experiment wird auch deutlich, dass B8 Zellen genügend intrazelluläres Ubiquitin aufweisen, das den kontrollierten Proteinabbau gewährleistet. Dies wird durch die Positivkontrolle (Immunopräzipitation mit  $\alpha\text{p53}$ - Antikörpern) veranschaulicht, der Tumorsuppressor wird ubiquitiniert und akkumuliert bei Inhibition des proteasomalen Systems. Somit ist im Grunde ein quantitativ limitierender Effekt des intrazellulären Ubiquitins auf den kontrollierten Proteinabbau eher unwahrscheinlich. Da es sich im Falle der stabil transfizierten B8 Zellen jedoch um gentechnisch veränderte Zellen handelt und infolge Selektion der pp89- produzierenden Zellen mit G418 von einer unphysiologischen Überexpression des immediate early gen product pp89 auszugehen ist, wäre hypothetisch auch ein quantitativer Mangel intrazellulären Ubiquitins zu diskutieren. Um einen derartig limitierenden Effekt auszuschließen, erfolgte erneut eine radioaktive Markierung (30min) von B8 Zellen und die folgende Immunopräzipitation mit dem  $\alpha\text{pp89}$ - Antikörper, wobei diese B8 Zellen im Vorfeld transient mit  $\text{His}_6$  markiertem Ubiquitin transfiziert wurden (Abb. 27). In diesem Ansatz wurde insbesondere auch das Verhalten des viralen Proteins im Zeitverlauf über mehrere Stunden beobachtet, auch nach 8 Stunden Inkubation lassen sich keine Veränderungen im Vergleich zum 30 Minutenwert bzw. 2 Stundenwert feststellen. Zum Vergleich sind jeweils C4 Zelllysate (Abb. 27 Spur 1) präzipitiert worden, die kein pp89 exprimieren. Mit Ubiquitin cDNA transfizierte B8 Zellen (Abb. 30, Spur 3 und 4) weisen jedoch keine präzipitierten Substrate auf, die höhermolekular als das pp89 sind. Auch in Zellen, die mit dem spezifischen Proteasominhibitor MG132 behandelt wurden, wurden keine

ubiquitinierten Proteine nachgewiesen. Lediglich lässt sich quantitativ mehr pp89 als Hinweis auf einen gehemmten proteasomalen Abbau des pp89 finden (Abb. 27 Spur 4, 2h und 4h).

Auch diesem Experiment zufolge liegt keine Polyubiquitinierung des pp89 vor. Somit ergibt sich aus sämtlichen durchgeführten Experimenten kein Indiz für einen Ubiquitin- abhängigen Abbau des viralen Proteins pp89.



**Abb. 27: Immunopräzipitation von pp89 aus B8 Zellen, Zeitverlauf.** Sowohl C4 (Spur 1) als auch B8 (Spur 2) und mit His<sub>6</sub>-markiertem Ubiquitin transfizierte B8 Zellen (Spur 3, 4) wurden über 30min mit <sup>35</sup>S Methionin markiert (pulse) und im Zeitverlauf nach 2, 4 und 8 Stunden geerntet (chase). Hemmung des Proteasoms für jeweils 2h mit 10μM MG132 (Spur 4). Immunopräzipitation mit cpp89- Antikörpern, Auftrennung in der SDS- PAGE. Der inhibierende Einfluss von MG132 wird deutlich, allerdings besteht hier kein Anhalt für eine Ubiquitinierung des pp89.

### 3.3 Abbau des ODCpp89 Fusionsproteins durch das 26S Proteasom

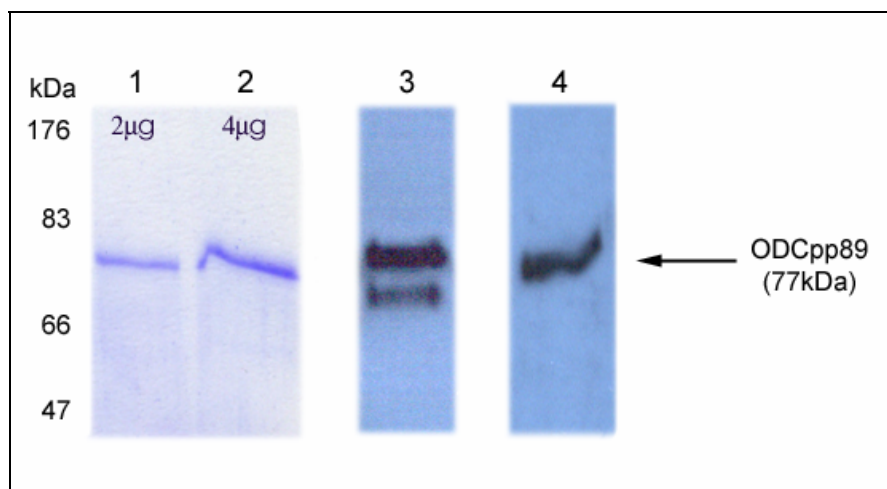
Wie bereits mehrfach ausgeführt, werden höhermolekulare Proteine normalerweise durch das 26S Proteasom abgebaut, andererseits ist dafür in der Regel eine Polyubiquitinierung des Substrates erforderlich. Hingegen wurde für die ODC der Ubiquitin- unabhängige Abbau durch das 26S Proteasom in Anwesenheit von Antizym beschrieben (vgl. 1.3). Ben-Shahar *et al.* charakterisierten diesen Abbauweg für eine Reihe von Epitopen, indem sie eine 12mer Aminosäuresequenz an den C- Terminus der ODC fusionierten. Diese Sequenz beinhaltete das H-2K<sup>b</sup>- restringierte Ovalbuminepitop SIINFEKL. Mittels dieses Konstruktes konnten sowohl das Epitop als auch Precursorpeptide durch das 26S generiert werden (Ben-Shahar 1999). In einem ähnlichen Ansatz sollte der Abbau für ein ODCpp89 Fusionsprotein analysiert werden. Dabei galt es, die Frage zu klären, ob das 26S Proteasom in der Lage ist, das korrekte pp89 Epitop (YPHFMPNTL) ohne Zusatz von Ubiquitin zu generieren.



und den pREST A- Expressionsvektoren zunächst Klone von pREST A und jeweils einem Insert erzeugt. Nach Testung der positiven Klone mit der PCR, anschließendem Restriktionsverdau und Ligation konnten schließlich Klone mit der entsprechenden Fusionssequenz selektioniert werden.

### 3.3.2 Expression und Aufreinigung des rekombinanten ODCpp89Fusionsproteins

Die Plasmid- DNA des Klons A1 wurde zur Expression in BL21- Zellen transformiert. Die Expression des Fusionsproteins, die anschließende Lyse der Bakterien und die Aufreinigung des His- getaggtten Proteins erfolgte wie in 2.2.2.11 beschrieben. Das Protein wurde unter denaturierenden Bedingungen isoliert, da im Falle eines nativen Reinigungsverfahrens eine extrem geringe Proteinausbeute beobachtet wurde. Da trotz zahlreicher Waschschrte des Ni- NTA- Agarosematerials mit verschiedenen Puffern (Zusatz von 1.5M NaCl, 1% Tween 20 und mit variablen pH- Werten) immer eine Kopurifikation diverser Proteine in geringer Konzentration beobachtet wurde, erfolgte die Auftrennung des gesamten eluierten Proteins in der SDS-PAGE. Anschließend wurde die spezifische Bande des ODCpp89 Fusionsproteins ausgeschnitten und aus dem Gel elektroeluiert. Dadurch wurde eine hohe Reinheit erzielt.

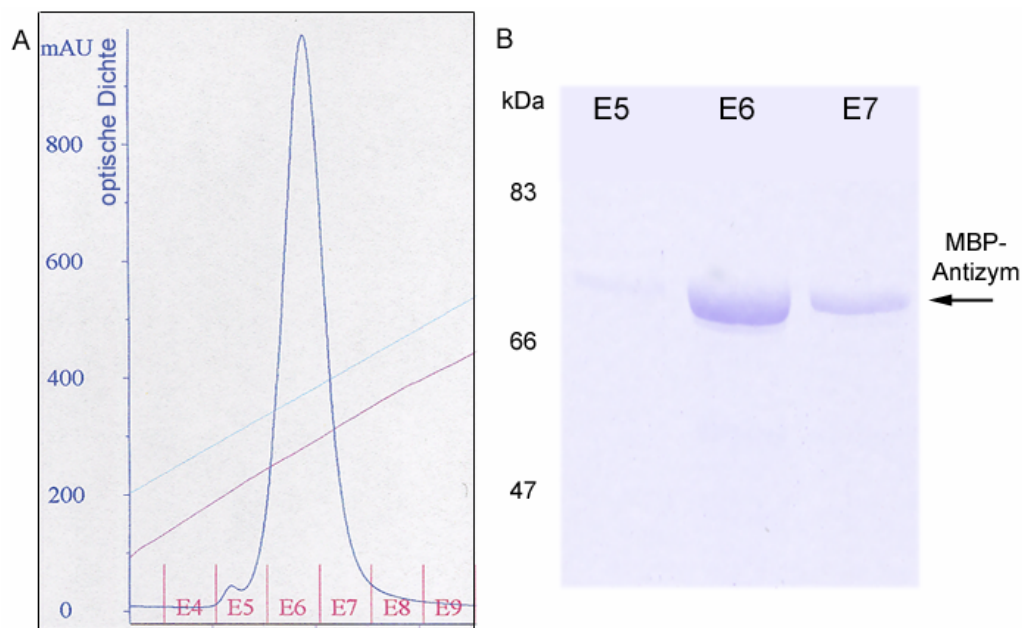


**Abb. 30: Aufreinigung des ODCpp89 Fusionsprotein, Coomassie- Färbung und Westernblot.**

Nach Isolation des getaggtten Fusionsproteins nach beschriebenem Protokoll (vgl. 2.2.2.11) wurden die Proben in 12,5%igen Polyacrylamidgelen getrennt und mit Coomassie gefärbt. In Spur 1 und 2 sind jeweils 2 und 4 µg des Proteins mit zu erwartendem Molekulargewicht (77kDa) sichtbar. Nach Blotting der Proteine erfolgte der spezifische Proteinnachweis mit  $\alpha(\text{RGS})_4\text{His-}$  (Spur 3) und app89- Antikörpern (Spur 4).

### 3.3.3 Expression und Aufreinigung von Antizym

Der Abbau der ODC erfolgt durch das 26S Proteasom in Abhängigkeit eines regulierenden Proteins, dem Antizym. Die Plasmid- DNA des Antizyms wie auch für ODC wurde uns freundlicherweise von Frau Dr. Y. Murakami (Tokio, Japan) zur Verfügung gestellt. Das mit MBP (maltose binding protein) assoziierte Antizym wurde exprimiert (vgl. 2.2.2.12) und entsprechend dem Protokoll isoliert (Abb. 31).

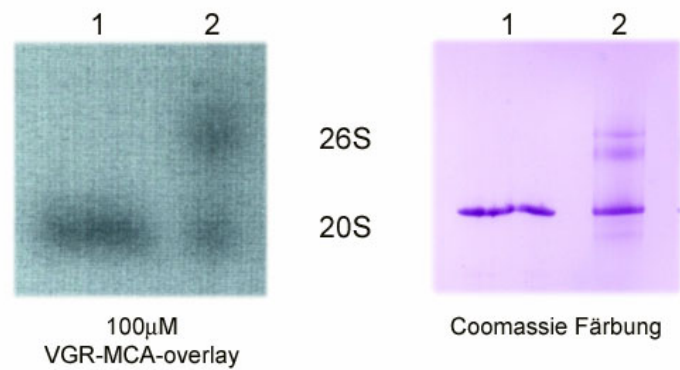


**Abb. 31: Aufreinigung des Antizyms.** Nach Expression des MBP- Antizym und Bindung an Amylose- Resin erfolgte die Elution mit dem Maltose- haltigen Puffer. Das Eluat wurde zweimal in der FPLC über einen NaCl-Gradienten getrennt (Proteinpeaks E6, E7). Nach Trennung der Eluate liegt das Antizym homogen vor. Die Peakfraktionen (E5), E6 und E7 in der Coomassiefärbung entsprechen den Fraktionen des Chromatogramms.

### 3.3.4 *In vitro* Verdau des rekombinanten ODCpp89 durch das 26S Proteasom

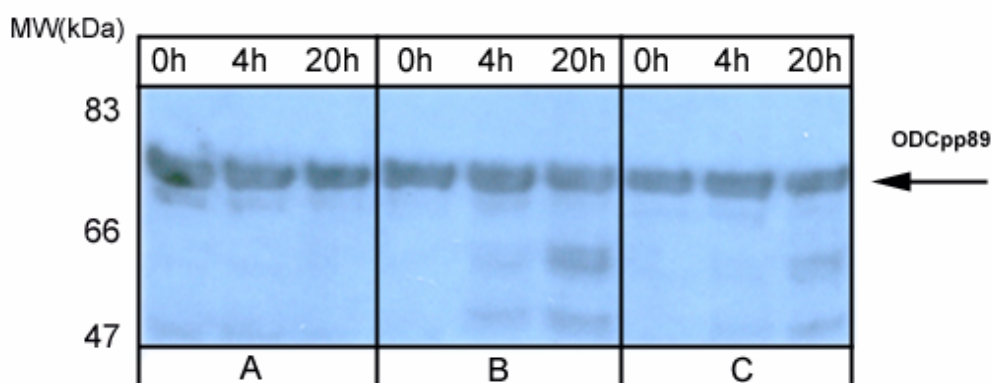
Ähnlich wie unter 3.1.3 für das rekombinante pp89 beschrieben, wurde der Abbau des ODCpp89 Fusionsproteins analysiert. Das eingesetzte 26S Proteasom stammt aus humanen Erythrozyten und wurde freundlicherweise von Frau Dr. B. Braun (Charité Berlin) zur Verfügung gestellt. Zunächst sollte die Aktivität des 26S Proteasoms überprüft werden, da während der Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  mit einem Zerfall in den 20S Core- Komplex und die 19S Regulatoren zu rechnen ist. Dazu wurde eine native Gelelektrophorese durchgeführt, die eine Trennung von 20S und 26S Fraktionen gestattet. Die Aktivität des Proteasoms konnte nach Inkubation (Overlay) mit  $100\mu\text{M}$  Bz-VGA-AMC durch die fluoreszierende Eigenschaft der abgespaltenen AMC- Gruppe detektiert werden.





**Abb. 32: Aktivität des 26S Proteasoms.** Die aus humanen Erythrozyten isolierten 26S Proteasomen wurden in einer nativen Gelelektrophorese aufgetrennt und mit einem Substratoverlay (100µM Bz-VGA-AMC) nachgewiesen. In Spur 1 ist zur Kontrolle reines 20S Proteasom aufgetragen, in Spur 2 das in den Verdau eingesetzt 26S. Im Anschluss wurde das Gel mit Coomassie gefärbt. Das 26S Proteasom (Spur 2) zeigt 26S Aktivität und darüber hinaus ist partiell zerfallenes 26S in Form des 20S Core-Komplexes sichtbar.

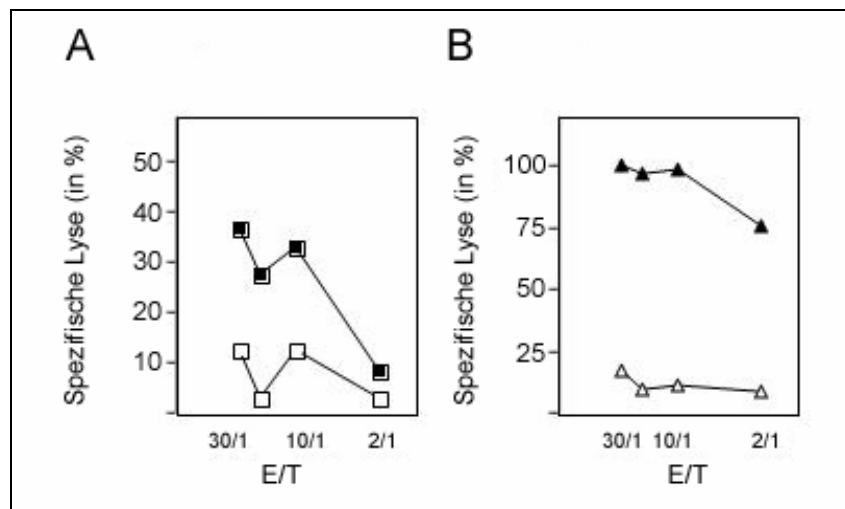
In den Verdauanalysen wurde das ODCpp89 Fusionsprotein mit Antizym, 1mM ATP und 26S Proteasomen in einem ATP- generierenden System (1mM ATP, 10mM Kreatinphosphat, 50ng/µl Kreatinkinase) bei 37°C inkubiert und die Reaktion nach 0, 4 und 20 Stunden mit 1% TFA gestoppt. Zunächst wurden die Verdauprodukte in einer SDS-PAGE analysiert und das spezifische Protein im Westernblot (αpp89 -Antikörper) nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde dieselbe Inkubation ohne 26S Proteasom untersucht (Abb. 33 A), in einem weiteren Ansatz hingegen neben dem Proteasom der spezifische Inhibitor Epoxomicin (2µM, Abb. 33 C) zugesetzt. In dem dargestellten Westernblot (Abb. 33) zeigt sich im Zeitverlauf ein stabiles ODCpp89 Fusionsprotein in Anwesenheit von 26S. Für den Proteasominhibitor lässt sich ebenfalls kein in diesem Verfahren nachweisbarer Effekt finden, wonach aus diesem Experiment zunächst kein Anhalt für den Abbau des ODCpp89 Fusionsproteins durch das 26S Proteasom besteht.



**Abb. 33: *In vitro* Abbau des rekombinanten ODCpp89 Fusionsproteins durch das 26S Proteasom.** Das Fusionsprotein (50nM (4µg)), wurde in folgendem Ansatz bei 37°C für 0, 4, 20 h inkubiert: 40mM Tris HCl, pH 7.4, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 1mM ATP, 10mM Kreatinphosphat, 50ng/µl Kreatinkinase, 10nM 26S (13.4µg), 11µg Antizyme. Die Reaktionen wurden in SDS-PAGE und Westernblot (polyklonaler αpp89- Antikörper) analysiert.

A: Kontrolle ODCpp89 + Antizym ohne 26S; B: ODCpp89 + Antizym + 26S; C: ODCpp89 + Antizym + 26S + 2µM Epoxomicin

Den Literaturangaben entsprechend kann jedoch von quantitativ geringen Mengen des Substratumsatzes und einem prozessiven proteasomalen Abbau ausgegangen werden. Auch für das ODCpp89 Fusionsprotein konnte der hochsensitive CTL- Assay zum Nachweis geringer Mengen des generierten pp89 Epitops erfolgreich ausgenutzt werden. Der Test wurde analog zum Verdau des rek pp89 durchgeführt. Lediglich die Beladung der Targetzellen erfolgte mit dem 0- und 20Stundenwert des ODCpp89 Verdaus mit dem 26S Proteasom bzw. mit dem Kontrollpeptid YPHFMPTNL. Aus Abb. 34 A wird deutlich, dass 26S Proteasomen tatsächlich in Anwesenheit von Antizym in der Lage sind, das pp89 Epitop suffizient in für die CTL- Erkennung nötigen Mengen aus dem ODCpp89 Fusionsprotein zu generieren.



**Abb. 34: Detektion des H-2L<sup>d</sup> restringierten pp89 Epitops YPHFMPTNL im CTL Assay.** A: P815-Zellen (murine Mastozytomazellen) wurden mit <sup>51</sup>Cr markiert und im Anschluss für 4 Stunden mit dem Verdauansatz (20h) von ODCpp89 Fusionsprotein und 26S (schwarze Quadrate) inkubiert. Leere Quadrate symbolisieren den Nullstundenwert. B: Als Kontrollpeptid fungierte das 9mer YPHFMPTNL (schwarze Dreiecke), es wurde ebenfalls über 4 Stunden mit P815-Zellen inkubiert. Leere Dreiecke entsprechen dem Nullstundenwert. Die Lyserate wurde anhand der <sup>51</sup>Cr Freisetzung ermittelt.

## 4 Diskussion

Das Potential zur Elimination von viralen Infektionen hängt in starkem Maß von der Fähigkeit der Organismen ab, Peptide aus viralen Proteinen zu generieren und diese nach Bindung an MHC Klasse I- Moleküle auf der Zelloberfläche den spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8<sup>+</sup>) zu präsentieren. Der überwiegende Teil der MHC Klasse I- Liganden findet seinen Ursprung in zellulären Proteinen, die durch das 26S Proteasom generiert werden. Ein Beispiel für einen proteasomal generierten MHC Klasse I- Liganden ist das Nonapeptid YPHFMPTNL, das vom immediate early Phosphoprotein 89 (pp89) des murinen Cytomegalievirus (mCMV) abstammt. Obwohl mehrere Proteasen und Peptidasen bekannt sind, die an der Generierung von MHC Klasse I- Liganden beteiligt sind, scheint die Prozessierung des korrekten C- Terminus, der für die meisten Proteine eine wichtige Ankerposition darstellt, hauptsächlich durch das Proteasom zu erfolgen. (Rock 1994, Kloetzel 2001, Rock & Goldberg 1999). Die virale Immunabwehr sowie das Potential des mCMV, diese Immunantwort zu umgehen, sind insbesondere im Mausmodell für das mCMV ausführlich untersucht. Die Präsentation des H-2L<sup>d</sup> restringierten mCMV Epitops YPHFMPTNL des pp89 auf der Zelloberfläche hat eine Aktivierung spezifischer CTLs zur Folge (Reddehase 1989, del Val 1991, Reddehase 2002). Damit spielt das pp89 im Rahmen der Immunabwehr eine besondere Rolle und sollte in seiner proteasomabhängigen Degradation detailliert analysiert werden.

### 4.1 Prozessierung des rekombinanten pp89

#### 4.1.1 Abbau des rekombinanten pp89 durch das 20S Proteasom

Mit Hilfe synthetischer pp89- Polypeptide (21-40mer Peptide), die das untersuchte L<sup>d</sup>- Epitop enthalten, wurde gezeigt, dass 20S Proteasomen *in vitro* das korrekte H2-d restringierte Epitop YPHFMPTNL nur in geringen Mengen generieren. Allerdings entsteht das N- terminal extendierte 11mer Precursorpeptid des Epitops weitaus häufiger. Dieses wird auch vom TAP für den Transport in das ER gegenüber dem 9mer präferiert (Boes 1994; Dick 1996, Knühl 2001). Um der physiologischen Situation näher zu kommen, wurde ein rekombinantes pp89 synthetisiert und dessen proteasomaler Abbau untersucht. Das unter denaturierenden Bedingungen gereinigte rekombinante Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 56kDa weist in der SDS-PAGE ein unerwartetes Laufverhalten bei 75kDa auf. Das Protein zeigte aber im Westernblot sowohl mit dem monoklonalen  $\alpha$ His- und dem polyklonalen  $\alpha$ pp89- Antikörper eine positive Reaktion. Des Weiteren wurde die pp89- Proteinsequenz in der ESI-MS/MS- und Edman- Sequenzierung identifiziert. Worauf dieses veränderte Molekulargewicht zurückzuführen ist, blieb letztendlich unklar, da weder native Reinigungsmethoden noch die gelelektrophoretische Auftrennung im Harnstoffsystm einen Einfluss auf das Laufverhalten zeigten. Eine Dimerisierung des pp89 ist aufgrund des

konstanten höhermolekularen Laufverhaltens unter denaturierenden Bedingungen als unwahrscheinlich anzusehen. Spezifische Merkmale innerhalb der Tertiärstruktur des Proteins, wie posttranslationale Modifizierungen, wären theoretisch denkbar und könnten einen Einfluss auf die Detektion im SDS- Gel ausüben. Des Weiteren sei auf die als Tag fungierenden Histidinreste verwiesen, deren pH- abhängiges Ladungsverhalten ebenfalls die Detektion des Proteins im Polyacrylamidgel bestimmen könnte. Auffallend ist die hohe Anzahl negativer Ladungen, der isoelektrischer Punkt (pI) beträgt nach theoretischen Berechnungen 4.73. Dies könnte ebenfalls Auswirkungen auf die Faltung und das Laufverhalten haben.

Zunächst wurde die Frage geklärt, ob gereinigte 20S Proteasomen in der Lage sind, *in vitro* das partiell gefaltete Protein (vgl. CD- Spektrum 3.1.4) abzubauen und dabei das korrekte 9mer Epitop bzw. den 11mer Precursor zu generieren. Die Verdauanalysen mit 20S Proteasomen wurden ohne Zusatz von Detergentien wie SDS oder anderen, das Proteasom stimulierenden Substanzen durchgeführt (Coux *et al.* 1996). Dies ist insbesondere deshalb hervorzuheben, da in bisherigen *in vitro* Verdaus SDS regelmässig verwendet wurde und dabei nicht nur die Interaktion mit dem Substrat von Bedeutung ist. SDS nimmt vielmehr direkt Einfluss auf das „gating“ und die Ladung des 20S Core- Komplexes, indem es Auswirkungen auf das Oberflächenmilieu vor allem der  $\alpha$ - Ringe ausübt. Es scheint dabei den Effekt des PA28 bzw. von hydrophoben Peptiden (siehe unten) auf eine Öffnung der  $\alpha$ - Ringe zu simulieren und kann damit den Substratzugang des 20S Core- Komplexes öffnen und eine Aktivierung des Substratabbaus bewirken (Kisselev 2002). Die Verdaus mit rekombinanten pp89 wurden jedoch ohne SDS durchgeführt. Das rekombinante pp89 wurde durch das 20S Proteasom unter diesen Bedingungen bemerkenswerterweise bereits nach 4h annähernd vollständig abgebaut (Abb. 18 A). Der proteasomale 20S Core- Komplex wurde in Kontrollexperimenten mit jeweils 10 $\mu$ M MG132 und 2 $\mu$ M Epoxomicin inhibiert, woraufhin sich der Abbau von pp89 im Falle des hochpotenten Epoxomicin nahezu vollständig, bei MG132 über mindestens 8h inhibieren ließ. Demnach ist der Abbau des rekombinanten Proteins eindeutig dem 20S zuzuschreiben. Ohne Zusatz des Proteasoms blieb das Protein stabil. Mit diversen Proteaseinhibitoren (vgl. 3.1.3) wurde gezeigt, dass keine weiteren Proteasen, die aus der Aufreinigung des rek pp89 oder des 20S Core- Komplexes weiterhin anwesend sein könnten, am *in vitro* Abbau des pp89 beteiligt sind. Insbesondere die Inhibition der Tripeptidyl Peptidase II (TTP II), einer möglichen Kontamination des aufgereinigten 20S Core- Komplexes, mit AAF- CMK erschien aufgrund des kürzlich beschriebenen endoproteolytischen Effekts des Enzyms und der Generierung des korrekten HIV- Nef (73- 82) Epitops im Gegensatz zum 20S Proteasom bedeutend zu sein. Die TPP II kann sowohl unabhängig vom Proteasom, aber andererseits auch mit dem Proteasom gemeinsam für die

Herstellung spezifischer MHC Klasse I- Liganden verantwortlich sein (Seifert 2003).

In Schnittanalysen von antigenen Peptiden des Ovalbumins mit 26S Proteasomen berichteten die Autoren über Schwierigkeiten, die einzelnen Fragmente z.B. in der HPLC sicher identifizieren zu können. Die Größe der generierten Fragmente lag in der Mehrzahl der Fälle bei 7 bis 8 AS, die Anzahl der verschiedenen Produkte sei vermutlich zu groß, um individuelle Fragmente zuordnen zu können. 26S Proteasomen generierten in Ovalbuminverdaus nur in 2% der Fälle das entsprechende 8mer Epitop (Cascio 2001). Princiotta *et al.* kalkultierten die Generierung von MHC Klasse I- Liganden unter Zuhilfenahme des Ovalbuminepitops detaillierter. Bei einer ungefähren Anzahl von  $8 \times 10^5$  funktionellen Proteasomen pro Zelle und unter Berücksichtigung von Synthese- und Abbauraten der intrazellulären Proteine wurde ein Substratumsatz des Proteasoms von  $2.5 \text{ min}^{-1}$  kalkuliert. Die Generierung von Komplexen aus MHC Klasse I ( $K^b$ ) und SIINFEKL (8mer Epitop des Ovalbumins) bezogen auf die Zahl der durch das Proteasom degradierten Ovalbumin- Substrate erfolgte mit einer Effizienz zwischen 1/440-1/3000. Proteasomen generieren die entsprechenden Precursorpeptide in 2.5% der Fälle (1/40), nur 2% (1/2000) dieser Peptide überleben den Weg vom Zytosol ins ER und können an MHC Klasse I- Moleküle binden (Princiotta 2003). Auch das spezifische 9mer YPHFMPTNL des pp89 wurde von Dick *et al.* als seltenes Produkt der Peptidverdaus beschrieben (Dick 1996). Die Analyse der in den Verdaus des rek pp89 generierten Peptidfragmente wurde zunächst mittels RP- HPLC und ESI- MS/MS durchgeführt. Dabei konnten in der HPLC unspezifische Peptidfragmente nach 20h Inkubation mit dem Proteasom nachgewiesen werden, das 9mer Epitop konnte jedoch nicht sicher gezeigt werden. Detaillierte Untersuchungen in der Massenspektrometrie hinsichtlich genauer Peptidsequenzen blieben ohne Erfolg. Aus den analysierten Proben ließ sich keine spezifische Sequenz sicher bestimmen. Neuere Analyseverfahren wie die Nano- HPLC oder Maldi Massenspektrometrie stellen viel versprechende alternative Nachweismethoden dar, die die Zuordnung von Peakmustern zu bestimmten Peptidsequenzen gestatten würden.

Der definitive Nachweis, dass konstitutive 20S Proteasomen aus dem rekombinanten Protein pp89 das pp89<sub>168-176</sub> L<sup>d</sup> restringierte MHC Klasse I- Epitop bzw. dessen 11mer Precursor generieren können, erfolgte mit spezifisch gegen dieses Epitop gerichteten zytotoxischen T- Lymphozyten (CTLs). Diese sind sowohl für das 9mer Epitop spezifisch, erkennen aber auch den Precursor. Bei einem Verhältnis von Effektor- zu Targetzellen von 1/27 zeigte sich für das *in vitro* verdaute Protein eine 59%ige Lyse (im Vergleich dazu in der Kontrolle mit dem antigenen Nonapeptid (100nM) 70% Lyse). Demnach ist der Nachweis eindeutig erbracht, dass konstitutive, nicht induzierte (d.h. ohne Zusatz von SDS) 20S Proteasomen *in vitro*

einerseits große, partiell gefaltete, lösliche Proteine abbauen und das gleiche antigene Peptid (9mer bzw. 11mer) generieren können wie im Falle der *in vitro* Prozessierung des 25mer Peptids oder von pp89 exprimierenden Fibroblasten (Eggers 1995, del Val 1989).

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass denaturiertes Ovalbumin ebenfalls ohne Ubiquitinierung *in vitro* abgebaut wird, allerdings war dafür eine Entfaltung des Substrats oder Aktivierung des 20S Proteasoms durch SDS notwendig. Unter den Produkten konnte durch Dick *et al.* das antigene Peptid SIINFEKL nachgewiesen werden (Dick 1994). Somit scheint eine Ubiquitinierung zumindest unter diesen unphysiologischen Bedingungen zunächst keine unabdingbare Voraussetzung für eine Degradation des Substrats durch den 20S Core- Komplex zu sein. Michalek *et al.* zeigten *in vivo* durch Mikroinjektion sowohl von chemisch denaturiertem und alkyliertem als auch von rekombinant synthetisiertem, gefaltetem Ovalbumin in Ubiquitinmutanten, dass insbesondere die Denaturierung der proteasomalen Substrate einen Effekt auf die MHC Klasse I- Antigenpräsentation ausüben kann. So wurde exogen synthetisiertes, natives Ovalbumin in der temperatursensitiven Ubiquitinkonjugationsmutante ts85 (E1- Inaktivierung) unter nicht- permissiven Bedingungen vermindert auf MHC Klasse I- Molekülen präsentiert, für das injizierte denaturierte Protein hingegen zeigten sich unter selben Bedingungen ähnliche Ergebnisse wie bei Wildtypzellen (Michalek 1996). Natives Ovalbumin bedarf einerseits einer Ubiquitinierung und demzufolge andererseits eines Abbaus durch das 26S Proteasom. Für anscheinend Ubiquitin- unabhängige Formen von Antigenen wie das denaturierte Ovalbumin ist jedoch sowohl die Aktivität des 20S als auch des 26S für eine Degradation und Epitopgenerierung denkbar. Denaturierte Substrate könnten von den Substratbindungsstellen des Proteasoms erkannt und im Anschluss direkt in das aktive Zentrum eingeschleust werden. Dies würde auch erklären, warum das rekombinante pp89 *in vitro* effektiv durch das 20S Proteasom abgebaut wird, da laut CD- Spektrum etwa 35% der Proteinstruktur in ungeordneter Knäuelstruktur vorliegen. Diese partielle Entfaltung scheint für den proteasomalen *in vitro* Abbau ausreichend zu sein.

Des Weiteren stellt sich die Frage, wie die entfalteten Proteinketten Zugang in das aktive Zentrum des zylinderförmigen 20S Core- Komplexes finden. Das „gating“ wird durch die  $\alpha$ - Ringe reguliert, wobei durch Mutationsanalysen insbesondere die N- terminalen Extensionen der  $\alpha$ 3- UE für die Öffnung der äußeren  $\alpha$ - Ringe verantwortlich gemacht werden konnten (Groll 2000). Kisselev *et al.* postulieren *in vitro* nicht-katalytische „modifier sites“ innerhalb oder an der Oberfläche der  $\alpha$ - Ringe, die durch Bindung von hydrophoben Peptidabschnitten eine Öffnung des Ringsystems bewirken würden und damit den Substratzugang in den 20S Core- Komplex freigeben sowie die Freisetzung degradiertter Peptidfragmente erleichtern

könnten. Gleichzeitig hätte die Bindung der hydrophoben Peptide eine Stimulierung der drei aktiven  $\beta$ -UE zur Folge. Die Experimente wurden mit synthetischen Tetrapeptiden durchgeführt, womit bislang ungeklärt ist, ob längere Peptide oder gar hydrophobe Domänen von Proteinen eine ähnliche regulierende Rolle spielen können. Gesetzt den Fall, dass diese im  $\alpha$ -Ring lokalisierten „modifier sites“ hydrophobe Sequenzabschnitte bzw. Domänen binden können, wären derartige hydrophobe Elemente von denaturierten oder oxidativ zerstörten Proteinen in der Lage, *in vitro* die Öffnung der  $\alpha$ -Ringe und damit ihren eigenen Abbau durch Zugang zu den gleichzeitig aktivierten, katalytisch aktiven  $\beta$ -UE und die Freisetzung der bei der Peptidhydrolyse entstandenen Produkte zu regulieren (Kisselev 2002). Benaroudj *et al.* vermuten, dass eine Denaturierung von Proteinen die Substraterkennung durch das konstitutive Proteasom erleichtern und damit die von ATPasen des 19S Komplexes katalysierte Entfaltung der Substrate simulieren könnte (Benaroudj 2000).

#### **4.1.2 Einfluss von PA 28 auf den Abbau von pp89 durch das 20S Proteasom**

Der Proteasomaktivator PA28 beeinflusst einerseits die Aktivität des Proteasoms, andererseits auch die Qualität der generierten Hydrolyseprodukte. Der genaue molekulare Mechanismus der Regulierung dieses ATP-unabhängigen Proteasomaktivators ist bislang nicht detailliert bekannt. Jedoch lassen *in vitro* Daten darauf schließen, dass PA28 einen positiven Einfluss auf die Substrattranslokation innerhalb des 20S Proteasoms ausübt. Der Substratumsatz scheint durch die Translokation des Proteins bzw. Peptids in das Proteasom limitiert zu sein. Sowohl die Bindung von homomeren als auch heteromeren rekombinanten PA28 Komplexen an Proteasomen führt zu einer gesteigerten Peptidtranslokation. Somit scheint PA28 einen allosterischen Effekt auf die Substratbindung auszuüben, damit das „channelling“ zu regulieren, ohne dass sich dadurch die maximale Aktivität des 20S Core Komplexes ändern würde (Stohwasser 2000). Strukturanalysen von Groll *et al.* zufolge sind die N-terminalen Peptidsequenzen der  $\alpha 3$ -UE für die geschlossene Konformation des 20S Proteasomes verantwortlich (Groll 2000). Eine Bindung von PA28 bewirkt die Umlagerung dieser Sequenzen, wodurch das „gate“ in den Core Komplex geöffnet wird (Whitby 2000, Kopp 2001). Somit scheint PA28 sowohl das „gating“ als auch das „channelling“ des Proteasomes zu beeinflussen.

Um den Einfluss des PA28 auf den Substratumsatz des rek pp89 zu verfolgen, wurde das rekombinante Protein mit 20S Proteasomen in Anwesenheit von PA28 *in vitro* verdaut. In Westernblots konnte kein stimulierender Effekt auf den proteasomalen Abbau des rekombinanten Proteins gezeigt werden. Vielmehr schien es unter Zugabe von PA28 zu einer reduzierten Effizienz des Substratumsatzes zu kommen.

Demnach stellt sich die Frage, welchen Einfluss PA28 auf die Generierung anderer antigenen Peptide ausübt bzw. wie dieser anscheinend inhibitorische Effekt auf den proteasomalen Abbau des rek pp89 zu erklären ist. Bislang konnte kein Nachweis erbracht werden, dass PA28 einen Effekt auf die MHC Klasse I Antigenexpression auf der Zelloberfläche im Sinne einer gesteigerten Epitopräsentation ausüben würde. In verschiedenen Studien mit viralen Epitopen zeigten sich differente Auswirkungen des PA28 auf die Antigenpräsentation. In einigen Fällen (z.B. Adenovirus E1A, LCMV Nukleoprotein) hatte eine PA28 Überexpression keinerlei Veränderung der Immunantwort zur Folge (Sijts, 2002). Andererseits zeigten Sun *et al.*, dass ein vom Melanoma- Differenzierungsantigen stammendes T- Zellepitop (TRP2- „tyrosinase related protein 2“) nur in Anwesenheit von PA28 generiert wird (Sun 2002). PA28 weist demnach offenbar Epitop- spezifische Effekte auf die Antigenpräsentation auf.

In Einklang mit den experimentellen Daten sind auch Ergebnisse von Ma *et al.* zu interpretieren, die zwar einen positiven allosterischen Effekt von PA28 auf die Peptidprozessierung des 20S Proteasoms nachweisen konnten, jedoch für den Abbau großer Proteine wie Casein und Lysozym keine Stimulierung des Proteasoms aufzeigten (Ma 1992). Wie bereits erläutert, könnte PA28 Änderungen der Konformation innerhalb des 20S Komplexes bewirken und somit „gating und „channelling“ beeinflussen. Der inhibitorische Effekt von PA28 auf den proteasomalen Abbau des rek pp89 könnte insofern erklärt werden, als dass durch die Bindung des Aktivators potentielle Bindungsstellen für hydrophobe Proteindomänen bzw. bereits generierte Peptide in den äußeren  $\alpha$ - Ringen infolge der Ausbildung von Wechselwirkungen zwischen PA28 und  $\alpha$ - UE blockiert werden würden, die für den schnellen Substratumsatz großer, denaturierter Proteine vonnöten zu sein scheinen. In Abwesenheit von PA28 wird rek pp89 schnell degradiert, die Regulierung des Substratzugangs innerhalb des 20S Core- Komplexes durch hydrophobe Peptide, respektive Proteindomänen ist unter 4.1.1 dargestellt (Kisselev 2002). Wird hingegen PA28 zum Reaktionsansatz hinzugegeben, scheinen diese regulatorischen „modifier sites“ blockiert zu sein. Der stimulatorische Effekt des PA28 auf den proteasomalen Proteinabbau scheint im Fall des rek pp89 nicht den indirekt hemmenden Einfluss ungebundener hydrophober Peptidsequenzen kompensieren zu können.

Untersuchungen intestinaler Mukosazellen im Vergleich mit anderen Geweben (Maus) zeigten sich ein gewebespezifisches Muster variierender  $\alpha$ - Untereinheiten innerhalb des 20S Komplexes. Bemerkenswert erschien dabei, dass insbesondere bei den  $\alpha 4$ - und  $\alpha 6$ - Untereinheiten Differenzen, die auf eine posttranslationale Modifizierung hinweisen, beobachtet wurden. Da  $\alpha$ - Untereinheiten mit PA28, aber auch mit anderen zellulären oder viralen Proteinen interagieren können, wird ihnen eine regulierende Funktion zugesprochen



(Kuckelkorn 2002). Somit wäre eine Interaktion der  $\alpha$ - Untereinheiten des 20S mit dem PA28 denkbar und könnte den verminderten Substratumsatz von Proteinen des Weiteren erklären.

#### **4.1.3 Abbau des rekombinanten pp89 durch das Immunoproteasom**

Immunoproteasomen fördern Peptidhydrolysen nach hydrophoben und basischen Aminosäuren (Sijts 2000a, Sijts 2000b, Schwarz 2000) und schneiden vermindert nach sauren Aminosäuren (Gaczynska 1994). Die Oberflächeneigenschaften der dabei generierten Peptide korrelieren mit der Aminosäurepräferenz verschiedener MHC-Haplotypen. Demzufolge wurde der proteasomale Abbau des rekombinanten pp89 durch das Immunoproteasom untersucht. Die Aktivitäten des konstitutiven und des Immunoproteasoms waren in den Versuchen annähernd identisch (Daten nicht gezeigt). Trotzdem scheinen Immunoproteasomen das pp89 *in vitro* unter selben Verdaubedingungen langsamer abzubauen als konstitutive Proteasomen. Eine Aussage über die Generierung des spezifischen Epitops YPHFMPTNL lässt sich lediglich aus dem Westernblot nicht treffen. Die in der RP-HPLC analysierten Verdaus des pp89 durch das i20S zeigten ähnliche Chromatogramme mit unspezifischem Peakmuster wie für das c20S (Abb. 20). Eine Zuordnung zum Nonapeptid konnte aufgrund dieser Daten nicht erfolgen. Allerdings ist aufgrund der Ähnlichkeit der Westernblots und der HPLC- Daten im Vergleich zum konstitutiven 20S Proteasom ebenfalls von der Generierung des in den CTL Assays nachgewiesenen antigenen Epitops bzw. des 11mer Precursors auszugehen.

Die durch IFN $\gamma$  induzierte Synthese der Immunountereinheiten  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i und  $\beta$ 5i und die anschließende Inkorporation bedingt filigrane Änderungen der Gesamtstruktur des 20S Komplexes und könnte die Eigenschaften der Substratbindungsregion und so den Zugang zu den verschiedenen aktiven  $\beta$ -Untereinheiten des 20S Komplexes beeinflussen (Sijts 2000a). Demnach würde sich, wie bereits ausgeführt, natürlich auch das zeitliche Schnittverhalten ändern können. Dadurch könnte der zeitlich verzögerte Abbau des rek pp89 durch Immunoproteasomen im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen bedingt sein.

#### **4.2 Polyubiquitinierung als Abbausignal des pp89 *in vivo*?**

Aufgrund der Fähigkeit des 20S Proteasoms, aus dem rekombinanten pp89 Protein das pp89 Epitop zu generieren und der Tatsache, dass die Präsentation dieses MHC Klasse I- Liganden auf murinen Fibroblasten (B8 Zellen) vom Proteasom abhängig ist, stellte sich die Frage, ob der intrazelluläre Abbau des viralen Proteins der Polyubiquitinierung desselben bedarf. Folgende Gesichtspunkte können berücksichtigt werden, um den Abbau eines spezifischen Proteins durch das Ubiquitin- Proteasom- System zu bestimmen: 1) Reduktion des Substratumsatzes in den Zellen bedingt durch Inhibition des Systems mit chemischen Inhibitoren oder genetischen Mutationen, 2) Nachweis von Ubiquitin- Substrat- Konjugaten in den Zellen nach Hemmung des Proteasoms, 3) Rekonstruktion der *in vivo* Ergebnisse (d.h.

Ubiquitinierung und Degradation der Substrate durch das Proteasom) in *in vitro* Versuchen, 4) Assoziation von mutmaßlichen Substraten mit ubiquitinierenden Enzymen (Sheaff 2000). In den im Folgenden zu diskutierenden Experimenten standen vor allem die unter 1) bis 3) aufgeführten Punkte im Vordergrund.

#### **4.2.1 *In vivo* Analysen ergeben keinen Anhalt für eine Ubiquitinierung des pp89**

Eine Inhibition des proteasomalen Systems mit dem Peptiddehyd MG132 führte zu einem verminderten Abbau des rekombinanten pp89 *in vitro*, wodurch die Abhängigkeit der Herstellung des viralen Epitops vom Proteasom verdeutlicht wurde. Ähnliche Ergebnisse für die antigene Prozessierung von pp89 wurden in früheren Arbeiten auch *in vivo* erzielt. Die Gabe von IFN $\gamma$  oder eine Überexpression von PA28 $\alpha$  hatten eine erhöhte CTL- Antwort im Sinne einer vermehrten Peptidgenerierung durch das Proteasom zur Folge (Groettrup 1996). Die Akkumulation ubiquitinierten Proteine nach Gabe von MG132 konnte auch in allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektionsexperimenten mit HA- bzw. His-markiertem Ubiquitin gezeigt werden, jedoch ließen sich in keinem der durchgeführten Experimente Ubiquitin-pp89-Konjugate nachweisen.

Für den *in vivo* Abbau des pp89 konnte hier gezeigt werden, dass er durch das Proteasom erfolgt. Der fehlende experimentelle Nachweis einer dazu notwendigen Ubiquitinierung des konstitutiv exprimierten Proteins schließt die Abhängigkeit der Degradation von einer Konjugation mit Ubiquitin jedoch nicht vollständig aus. Allerdings deuten die gewonnenen Resultate auf einen Proteasom- abhängigen Abbau des pp89 ohne Ubiquitinkonjugation hin. Auch das 20S Proteasom kann, wie in einigen anderen Beispielen, auch *in vivo* an der Prozessierung großer Proteine beteiligt sein. Um den Ubiquitin- abhängigen bzw. - unabhängigen Abbau von pp89 detaillierter darzustellen, wären Mutationsanalysen mit K48R oder K63R- Mutanten oder mit Konjugationsenzymmutanten denkbar (Michalek 1996, Zhang 2003). In Zell- bzw. Mausmodellen, die die Ubiquitinkonjugationsmutante K48R aufweisen, konnte kürzlich gezeigt werden, dass diese temperatursensitiven Mutanten keinen Einfluss auf den Substratumsatz bei Infektion mit Moloney murinen Leukämie Viren (MLV) haben. Dies deutet darauf hin, dass eine Ubiquitinierung nicht essentiell für den Abbau viraler Proteine sein könnte (Zhang 2003).

#### **4.2.2 DRiPs - Ursprung antigenen Peptide**

Der überwiegende Teil der zurzeit identifizierten CTL- Epitope stammt von metabolisch stabilen Proteinen ab. Sie werden Proteasom- abhängig durch Degradation von defective ribosomal products (DRiPs) generiert, wobei DRiPs ubiquitiniert vorliegen oder mit einem alternativen Degradationssignal versehen sind. Die Formation solcher DRiPs kann durch Änderungen im zellulären Milieu induziert werden, wie sie z.B. infolge viraler Infektionen und Ausschüttung von Zytokinen im entzündeten Gewebe zu finden sind. Diese direkt an die

Ribosomen gebundenen Translationsprodukte können einerseits unreife Proteine im Sinne eines vorzeitigen Kettenabbruchs (tDRiP) oder Proteine falscher Konformation (mDRiP) sein (Schubert 2000). Demnach wäre auch zu diskutieren, ob überhaupt das native pp89 in der Zelle Vorläufer für das antigene Peptid YPHFMPTNL ist oder vielmehr gemäß obigen Ausführungen ein tDRiP oder mDRiP Ursprung dieses MHC Klasse I- Liganden sein könnte. Somit wäre eine Ubiquitinierung, wie sie im klassischen Weg des Ubiquitin- Proteasom- Systems beschrieben wird, für die Generierung des Epitops nicht zwingende Voraussetzung.

#### **4.2.3 Polyubiquitinierung als essentielles Degradationssignal?**

Der spezifische Nachweis, dass eine Polyubiquitinierung *in vivo* in einzelnen Fällen für den proteasomalen Abbau essentiell ist, lässt sich experimentell sehr schwierig erbringen. Ein großes Problem stellt die Vielzahl und Spezifität der einzelnen E2- und E3- Enzyme dar (vgl. 1.2). Andererseits sind diese experimentellen Schwierigkeiten auch auf das nur transiente Vorliegen von Ubiquitin- Protein- Konjugaten zurückzuführen, des Weiteren ist eine Inhibition der Ubiquitinierung bislang nur mit Ubiquitinaldehyden möglich (Tarsca 2000). Demzufolge erscheint es aufgrund der rapiden Degradation von Proteinketten durch deubiquitinierende Enzyme diffizil, diese potentiellen Konjugate von Mammaliaproteinen mit Ubiquitin zu detektieren (Sheaff 2000). Des Weiteren stellt sich nun die Frage nach der spezifischen Funktion des Ubiquitins im Rahmen der Antigenprozessierung durch das 26S Proteasom. Bisher wurde diskutiert, dass ubiquitinierte Proteine einerseits von verschiedenen Untereinheiten innerhalb des 19S Regulators erkannt und gebunden werden, andererseits die Ubiquitine durch die Isopeptidaseaktivität innerhalb des 19S Komplexes vom Substrat abgespalten und in der Zelle reutilisiert werden (Deveraux 1994, Bochtler 1999, Lam 1997). ATPase- Untereinheiten des 19S können wiederum bei der Entfaltung der Proteine mitwirken und somit Chaperon- artige Funktionen übernehmen (Braun 1999).

Wie lassen sich damit Beobachtungen in Einklang bringen, die den Abbau verschiedener Proteine als Ubiquitin- unabhängig beschreiben? Michalek *et al.* untersuchten den Abbau des Ovalbumins, das dem klassischen Degradationsweg mit Ubiquitinierung und Abbau durch das 26S Proteasom folgt (Ben-Shahar 1997, Michalek 1996). In Hinblick auf die Präsentation des korrekten MHC Klasse I- Liganden SIINFEKL wiesen endogen synthetisiertes Ovalbumin (mit Ovalbumin transfizierte Mutanten) als auch in das Zytosol mutierter Zellen injiziertes (Ubiquitin- Konjugationsmutante) chemisch denaturiertes, alkyliertes Ovalbumin bei nicht permissiver Temperatur ähnliche Ergebnisse wie Wildtypzellen auf. Im Gegensatz dazu führte die Injektion von nativem Ovalbumin zu einer verminderten Präsentation des Epitops (Michalek 1996). Wie bereits unter 4.1.1 erläutert, lassen diese Resultate auf einen Einfluss der Proteinstruktur des Substrats hinsichtlich des Ubiquitin- abhängigen Abbaus schließen. Modifizierungen innerhalb der Proteinstruktur im

Sinne einer Konformationsänderung können anscheinend die Notwendigkeit einer Ubiquitinierung aufheben. Somit kann eine Ubiquitinierung auch eine Denaturierung des Substrates zufolge haben, die wiederum den proteasomalen Abbau des falsch gefalteten bzw. entfalteten Proteins ermöglichen könnte. Die für das endogen exprimierte Ovalbumin postulierte Vermutung, dass es in einer falsch gefalteten Konformation vorläge, ließe sich auch auf das endogen exprimierte virale Protein pp89 übertragen, womit dessen Ubiquitin-unabhängiger Abbau durch das Proteasom im Einklang mit den Ergebnissen von Michalek *et al.* zu sehen wäre. Allerdings bleibt mit diesem Erklärungsansatz die Frage der Substraterkennung eines nicht- ubiquitinierten Proteins durch das Proteasom offen.

In Experimenten von Sheaff *et al.* wurde der proteasomale Abbau des CdK Inhibitors p21<sup>Cip1</sup> analysiert. Obwohl die Inhibition des proteasomalen Systems eine Verlängerung der Halbwertszeit des Proteins bewirkt und unter selben Bedingungen p21<sup>Cip1</sup>- Ubiquitin-Konjugate in der Zelle akkumulieren, scheint der Abbau des Proteins Mutationsanalysen zufolge selbst nicht direkt der Ubiquitinierung zu bedürfen. Demnach kann nicht zwangsläufig im Falle des Vorliegens von Ubiquitinkonjugaten und proteasomalem Abbau eines Proteins darauf geschlossen werden, dass die beobachtete Ubiquitinierung eine *Conditio sine qua non* für den proteasomalen Abbau des Proteins sei (Sheaff 2000). Auch in dieser Arbeit wird erneut auf den entscheidenden Einfluss der Proteinstruktur hinsichtlich der Erkennung und Degradation durch das Proteasom verwiesen, nicht strukturierte Proteine werden vom Proteasom direkt gebunden und ohne Ubiquitinierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* abgebaut (Michalek 1996). Für p21 konnte gezeigt werden, dass das freie Protein nicht in einer genau definierten Tertiärstruktur vorliegt, woraufhin es eventuell direkt von den  $\alpha$ -Ringen des 20S Core- Komplexes erkannt wird (Sheaff 2000).

In diesen Kontext seien auch nochmals die unter 4.2.2 erwähnten defective ribosomal products (DRiPs) erwähnt, für die unter anderem auch ein Ubiquitin- unabhängiger Abbauweg durch das Proteasom beschrieben wird (Schubert 2000). Sie stellen grundsätzlich Proteine mangelhafter Konformation dar, können aber auch verkürzte Proteine infolge vorzeitigen Kettenabbruchs sein. Die von Michalek und Sheaff durchgeführten Degradationsanalysen verschiedener Proteine sind auch in Einklang mit dieser DRiP-Hypothese zu sehen, woraufhin zusammenfassend auch *in vivo* der Abbau eines Proteins durch das 26S Proteasom nicht zwangsläufig der Ubiquitinierung desselben bedarf. Diese Aussagen bekräftigen einerseits die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der *in vivo* Ubiquitinierung des pp89 als auch die *in vitro* durchgeführten Degradationsstudien des rekombinanten pp89.

Der beschriebene Einfluss der Proteinstruktur auf den proteasomalen Abbau sei zusätzlich an einem weiteren Beispiel veranschaulicht. Tarsca *et al.* haben die Degradation von Calmodulin in seiner nativen Form, aber auch in der durch *in vitro*  $\text{Ca}^{++}$ -Entzug „gealterten“ Variante *in vivo* untersucht und dabei festgestellt, dass das „gealterte“ Calmodulin wesentlich schneller abgebaut wird als das native Protein. Calcium-Ionen stabilisieren die native Konformation des Calmodulins. Eine  $\text{Ca}^{++}$ -Zufuhr inhibierte den proteasomalen Abbau, stimulierte hingegen die Ubiquitinierung. In detaillierten *in vitro* Verdaus mit 26S Proteasomen konnte sowohl die native als auch die „gealterte“ Variante ohne Ubiquitinierung abgebaut werden. Der inhibierende Einfluss des  $\text{Ca}^{++}$  auf den Abbau ließ sich insbesondere für das native Calmodulin nachweisen, das „gealterte“ Protein zeigte ein ähnliches Degradationsverhalten wie ohne  $\text{Ca}^{++}$ -Gabe. Somit schlussfolgern die Autoren dieser Arbeit, dass flexible Konformationen von Proteinen den proteasomalen Abbau auch ohne Ubiquitinierung initiieren könnten (Tarsca 2000).

#### **4.2.4 Auf der Suche nach alternativen Degradationssignalen**

Die bislang diskutierten Punkte bezüglich der Erkennung von potentiellen Substraten durch das 26S Proteasom legen den Verdacht nahe, dass neben der Polyubiquitinierung des abzubauenen Proteins auch andere Degradationsmarker vorliegen müssen. Andererseits ist die Rolle des Ubiquitins im Rahmen des Ubiquitin- 26S Proteasom- Systems, wie bereits erwähnt, nicht vollständig auf die eines Erkennungssignals für Untereinheiten des 19S Regulators innerhalb des 26S Komplexes einzuengen, sondern unter anderem auch auf eine denaturierende Wirkung auf Proteine auszudehnen, die einen suffizienten Abbau durch das Proteasom ermöglichen könnte (Michalek 1996). Inwieweit ein Nachweis von Ubiquitin-Protein-Konjugaten für einen Ubiquitin-abhängigen Abbau dieses Proteins durch das Proteasom spricht, ist in Anbetracht differierender Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen kontrovers zu bewerten. So verfolgten Treier *et al.* zum Beispiel den Abbau des Onkoproteins cJUN; sie wiesen eine durch die  $\delta$  Region vermittelte Ubiquitin-abhängige Degradation des Proteins nach (Treier 1994). Experimente einer anderen Arbeitsgruppe wiesen allerdings auf alternative Degradationssignale des cJUN hin. Das *in vivo* instabile Protein konnte im zellfreien System ATP-abhängig ohne Ubiquitinierung abgebaut werden. Demnach könnten auch in diesem Fall intrinsische Strukturmerkmale für die selektive Erkennung durch das Proteasom und den Abbau durch das 26S Proteasom verantwortlich sein (Jariel-Encontre 1995).

Der Abbau anderer nukleärer Onkoproteine wie cMYC und cFOS durch das Ubiquitin-System wurde von Chiechanover *et al.* *in vitro* in einem Ubiquitin-zellfreiem System untersucht. ATP stimulierte den *in vitro* Abbau dieser Onkoproteine, die Degradation konnte hingegen durch Gabe neutralisierender Antikörper gegen das Ubiquitin-aktivierende Enzym

E1 inhibiert werden. Nach Substitution Affinitäts- gereinigter E1 Enzyme ließ sich der ATP- abhängige Abbau wiederherstellen, was auf einen Ubiquitin- abhängigen *in vitro* Abbau dieser Proteine hindeutet (Chiechanover 1991). Hirai *et al.* konnten hingegen für den *in vitro* und *in vivo* Abbau von cJUN und cFOS nachweisen, dass diese Transkriptionsfaktoren Substrate der  $\text{Ca}^{2+}$ - abhängigen Protease Calpain sind. Calpain ist insbesondere für den Abbau von Proteinen mit PEST- Motiven von Relevanz (Hirai 1991).

Inzwischen liegen auch Daten zur Ubiquitin- Abhängigkeit des Abbaus eines viralen Proteins vor. Miller *et al.* haben den Abbau des NS2 Phosphoproteins, eines nicht- strukturellen Proteins des murinen Parvovirus Minute Virus, durch das Proteasom analysiert (Miller 2001). Dies ist insbesondere von Interesse, da antigene Peptide viraler Proteine typische MHC Klasse I- Liganden darstellen. Der durch MG132, Lactacystin und Epoxomicin gehemmte proteasomale Abbau des NS2 Proteins unterliegt anscheinend keiner Ubiquitinierung. In Anwesenheit der Inhibitoren ließen sich keine höher molekularen Ubiquitin- Konjugate nachweisen. Da eine Elongationsmutante für die Ubiquitinketten (UbR7; Mutation der Lysine) und eine E1- Mutante (Ub- aktivierendes Enzym) nahezu keinen Einfluss auf die Stabilität des Proteins hatten, wurde auf einen Ubiquitin- unabhängigen Abbau des viralen NS2 Phosphoproteins geschlossen. Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage nach alternativen Degradationssignalen. Mutationen innerhalb bestimmter Regionen des NS2 Proteins zeigten zwei kritische Regionen (Nukleotidposition 2125-2175 und 2175-2268), die für die Stabilität des Proteins von Bedeutung zu sein scheinen. Diese „cis-acting elements“ partizipieren jedoch nur bedingt in der Stabilisierung des Proteins, zusätzlich müssen weitere Elemente existieren (Miller 2001). In Hinblick auf den Abbau des mCMV Proteins pp89 und die Suche nach Degradationssignalen wurde nach Übereinstimmungen zwischen den Proteinsequenzen des rekombinanten bzw. des endogen exprimierten pp89 mit dem NS2 Protein gesucht, wobei sich allerdings keine signifikanten Sequenzhomologien finden ließen. Allerdings können die beschriebenen Sequenzabschnitte des NS2 Proteins auch bestimmte Domänen bilden. Ein Vergleich zur Tertiärstruktur des pp89 ist jedoch aufgrund der unbekannten Proteinstruktur nicht möglich.

Kalejta *et al.* zeigten für den proteasomalen Abbau der Retinoblastoma- Familie von Tumorsuppressoren (Rb Proteine p105, p107 und p130), dass dieser nicht einer Konjugation an Ubiquitin unterliegt, sondern vielmehr das Phosphoprotein pp71 des hCMV (UL 82 Gen) Einfluss auf die Degradation der Rb Proteine nimmt. Dies trifft allerdings nur für mit hCMV infizierte Zellen zu, da p130 in Abwesenheit von pp71 Ubiquitin- abhängig vom Proteasom abgebaut wird. Das hCMV pp71 reguliert den Zellzyklus und stimuliert infizierte Zellen nach Arrest zwischen G1- und S-Phase des Zyklus, erneut in den Zellzyklus einzutreten und in die

S- Phase (DNA- Replikation) überzugehen. Der zugrunde liegende Mechanismus dafür ist eine Bindung des pp71 an die hypophosphorylierte Form des Rb Tumorsuppressor Proteins und die anschließende Ubiquitin- unabhängige Degradation des Rb Proteins p130. Welchen strukturellen Einfluss das pp71 auf das Rb Protein p130 nimmt oder wie es den Abbau des p130 durch das Proteasom steuert, wird von den Autoren jedoch nicht näher analysiert. Es wird lediglich darauf verwiesen, dass sowohl das Papillomavirus E7 Protein als auch das Simian Virus 40 T- Zellantigen (SV40) ähnliche Auswirkungen auf den Abbau der Rb Proteine haben können (Kalejta 2003).

Neben dem Ubiquitin sind so genannte PEST- Motive (Abb.7), die hydrophile Sequenzabschnitte mit entsprechenden Aminosäuren (P, E oder B, S, T) darstellen, als Degradationssignale von Proteinen bekannt (Rechsteiner 1996, Jarriel-Encontre 1995). In der Proteinsequenz des pp89 kommen laut Vorhersageprogrammen PEST- Motive (AS 54-76, AS 386-423, AS 423-513 und AS 513-535) vor ([www.expasy.org](http://www.expasy.org); 19.08.2003). Diese können als potentielle Degradationssignale für den Abbau durch das Proteasom diskutiert werden. Ein Abschnitt des pp89, der keine PEST-Motive enthält, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Ornithindecaboxylase (ODC) fusioniert, deren Sequenz zwei PEST- Motive aufweist (Abb.8). Die ODC wird vom 26S Proteasom Ubiquitin- unabhängig degradiert. Ähnlich wie im Falle des Ovalbuminepitops SIINFEKL (Ben-Shahar 1999) ist es auch für das pp89 9mer Epitop YPHFMPTNL gelungen, dieses aus einem Fusionsprotein mit ODC durch das 26S Proteasom ATP- abhängig zu generieren. Hierbei ist allerdings hervorzuheben, dass nicht wie in vorherigen Experimenten eine Epitop- flankierende Region mit der ODC fusioniert wurde, sondern vielmehr ein Protein (210AS) an die ODC gebunden wurde. Der CTL- Test zeigt eine deutlich gesteigerte Lyserate nach Beladung der Targetzellen mit dem 26S Verdau des Fusionsproteins. Damit konnte die Prozessierung eines physiologischen Substrats mit einem viralen Protein und Generierung eines authentischen MHC Klasse I- Liganden durch das 26S Proteasom *in vitro* gezeigt werden. Dieser beschriebene Abbau sollte den *in vivo* Bedingungen sehr nahe kommen, da die zelluläre Regulierung und damit der Metabolismus der ODC genau bekannt sind und die Versuchsbedingungen dementsprechend adaptiert wurden. Folglich scheinen 26S Proteasomen in ähnlicher Weise wie 20S Core- Komplexe in der Lage zu sein, unabhängig von der Proteingröße Epitope bzw. Precursor zu generieren. Seifert *et al.* konstruierten ein ODC/Ovalbumin- Fusionsprotein mit einem Epitop- tragenden HIV- Nef- Protein (AS 64-100) und verdauten dieses Fusionsprotein mit 26S Proteasomen unter Bedingungen, wie sie für das ODCpp89 Protein beschrieben sind. In Analogie zu *in vitro* Verdau eines HIV Nef- Proteins (AS 64-100) mit 20S Proteasomen konnte auch in den Verdau des NEF-ODC-Ovalbumin Fusionsproteins mit 26S Proteasomen keine Generierung des korrekten Epitops bzw. eines N- terminal elongierten Precursors

nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich in beiden Versuchsansätzen die Generierung eines ähnlichen Peptidmusters, was mit den Verdauanalysen des pp89 und des ODCpp89 Fusionsproteins korreliert (Seifert 2003). Hier wurden in beiden Fällen das 9mer Epitop bzw. der 11mer Precursor vom Proteasom generiert. Somit werden offenbar gemeinsame Struktur- und Sequenzmerkmale von den katalytisch aktiven Zentren des 20S Core-Komplexes der Proteasomen erkannt. Die Epitopgenerierung für das Nef- Protein ist hingegen, wie bereits aufgeführt, der Tripeptidyl- Peptidase II (TPPII) zuzuschreiben (Seifert 2003).

Die Primärstruktur von Proteinen und die daraus resultierende Konformation insbesondere in Hinblick auf die Oberflächenladung und Oberflächenhydrophobizität der Proteine scheinen beim Abbau von Proteinen eine wichtige Rolle zu spielen. Anhand der proteasomalen Degradation und MHC Klasse I- Epitopgenerierung des Nef Proteins, eines regulatorischen Proteins des HIV, und anschließender Sequenzanalysen fiel auf, dass die vom Proteasom prozessierten CTL- Epitope in so genannten Cluster Regionen vorkommen und weitaus häufiger generiert werden als Peptide aus Non- Cluster Regionen. Die Epitop- tragenden Cluster Regionen beinhalten vorwiegend hydrophobe Proteinabschnitte, wohingegen die Non- Cluster Regionen hydrophile Bereiche ausmachen. Somit lässt sich für das Nef Protein eine Korrelation zwischen Grad der Hydrophobizität, proteasomaler Prozessierung und der Dichte von CTL- Epitopen demonstrieren (Lucchiari-Hartz 2003). Die Bevorzugung hoch konservierter, hydrophober Sequenzabschnitte durch das Proteasom steht im Einklang mit der Schnittpräferenz des Proteasoms für hydrophobe P1 Reste, wie sie auch im Falle des pp89 Epitops (P1: Leucin) zu beobachten ist. Hydrophobe Interaktionen der Substrate mit der hydrophoben Innenseite des Proteasoms sind einerseits für die Translokation der Substrate, andererseits für die Stabilisierung des entfalteten Proteins von Bedeutung. Die für das HIV- Nef Protein charakteristischen Epitop Cluster lassen sich auch bei anderen Viren wie HBV, HCV oder den Tumorantigenen Melanoma Antigen gp100, PRAME Protein oder Her-2\_neu nachweisen. Somit scheint zumindest für klassische MHC Klasse I- Liganden die Hydrophobizität einer Proteinsequenz eine Art Degradationssignal für das Proteasom darzustellen (Lucchiari-Hartz 2003). Hydrophobe Proteinabschnitte innerhalb der Region des mCMV pp89 Epitops könnten somit für die Prozessierung des viralen Proteins zum spezifischen 9mer eine Rolle spielen. Hydrophobizitätsanalysen (Kyte & Doolittle) zufolge befinden sich 30 AS vor und etwa 15AS nach der Epitopregion des 9mers YPHFMPTNL hydrophobe Sequenzabschnitte. Die Epitopregion selbst ist nicht als hydrophob beschrieben worden ([www.expasy.org](http://www.expasy.org); 19.08.2003).



### 4.3 Modulation der proteasomalen Aktivität- ein zweiseitiges Modifier Modell

Wie die aktiven Untereinheiten des 20S Proteasoms ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$  in zwei Kopien) untereinander während der Proteindegradation koordiniert sind und vielmehr die Produktion der MHC Klasse I- Liganden steuern, stellt eine bislang nicht beantwortete Frage dar. Die Interaktionen zwischen den vermutlich kooperativen Untereinheiten werden zum gegenwärtigen Zeitpunkt im Sinne eines zweiseitigen Modifier Modells interpretiert (Schmidtke 2000). Der Einfluss des HIV Typ1 Proteaseninhibitors Ritonavir, ein seit mehreren Jahren in der Therapie des AIDS erfolgreich etabliertes Medikament, wurde auch bezüglich der Wirkung auf das Immunsystem, insbesondere der Produktion von viralen MHC Klasse I- Liganden untersucht. In mehreren Fällen wurde eine verminderte Antigenpräsentation unter Ritonavirapplikation beobachtet. So hemmt Ritonavir den Abbau des immediate early gen product pp89 des mCMV bei einer Konzentration von  $50\mu\text{M}$ , bei  $10\mu\text{M}$  waren diese Auswirkungen auf den Substratumsatz jedoch nicht nachzuweisen. Analysen über die Interaktion von Ritonavir und dem Proteasom, das für die Synthese dieser viralen Epitope verantwortlich ist, zeigten einerseits einen hemmenden Effekt von Ritonavir auf die Chymotrypsinaktivität ( $\beta 5$ ), andererseits eine Stimulierung der Trypsinaktivität ( $\beta 2$ ) (Schmidtke 1996). Das Ritonavir bindet nicht wie bisher beschriebene Proteasomeninhibitoren direkt an die katalytisch aktiven Untereinheiten, sondern vielmehr an eine katalytisch inaktive „modifier site“. Somit wurde ein zweiseitiges Modifier Modell postuliert, wobei ein Bindungsort durch das aktive Zentrum verkörpert ist, die zweite Bindungsregion hingegen als so genannte „modifier site“ an anderer, zurzeit noch unbekannter Lokalisation inner- oder außerhalb der  $\alpha$ - Ringe des 20S Core- Komplexes zu suchen ist. Von Interesse in diesem Kontext ist insbesondere die physiologische Rolle eines derartigen Modifier Modells. Potentielle Liganden wie SDS, Cardiolipin, Polykationen oder Fettsäuren, für die ein regulierender Effekt auf die Proteasomaktivität beschrieben wurde, könnten im Rahmen dieses Modells ebenso wie der PA28 oder 19S Regulator einen Einfluss auf die proteasomale Aktivität haben. Die Auswirkungen von Ritonavir im Sinne einer verminderten MHC Klasse I- Antigenpräsentation und folglich reduzierter zytotoxischer T-Zellantwort legen einen pharmakologischen Angriffspunkt der so genannten „modifier sites“ nahe (Schmidtke 2000). Würde es gelingen, diese Bindungsorte näher zu charakterisieren und entsprechende die Peptidhydrolyse steuernde Liganden ausfindig zu machen, könnte man therapeutischen Einfluss auf die Generierung von MHC Klasse I- Liganden nehmen. Dies wäre einerseits im Sinne eines inhibitorischen Effekts auf die Epitopgenerierung insbesondere zur Verhinderung von Transplantatrejektionen denkbar. Eine regulierte Hemmung des Proteasoms könnte diese Rejektionen reduzieren, andererseits könnte durch kontrollierte Inhibition des Proteasoms die notwendige immunsupprimierende Therapie dezimiert und das Risiko von Infektionen vielfältiger Natur vermindert werden. Konzipiert man den konkreten Fall eines Allograft- Patienten genauer, wäre eine Hemmung durch

spezifische Liganden der „modifier sites“ wünschenswert, wodurch die Präsentation von Fremddantigenen gegenüber körpereigenen T- Lymphozyten wesentlich reduziert wäre. Demgegenüber würde im Fall einer weiterhin notwendigen immunsuppressorischen Therapie bei Organtransplantierten vielmehr eine Stimulierung der proteasomalen Aktivität in Anbetracht der potentiellen Infektionskrankheiten, auch gerade hinsichtlich der klinischen Relevanz einer hCMV- Infektionen bei prädisponierten Patienten, gewollt sein. Die CID (cytomegalic inclusion disease) ist klinisch charakterisiert durch eine interstitielle Pneumonie, gastrointestinale Manifestationen, Hepatitis und ein Transplantatversagen, die therapeutisch auch gerade angesichts der oftmals parallel notwendigen Immunsuppression schwer zu beherrschen sind. Die unter diesen Bedingungen apparente Infektionskrankheit ist des Weiteren durch zahlreiche Mechanismen zur Umgehung der iatrogen schon massiv eingeschränkten Immunantwort charakterisiert (vgl. 1.4.2.1). Somit wäre ein zu den klassischen Medikamenten wie Ganciclovir konträrer Therapieansatz denkbar, wobei ein Ligand einer bislang unbekannten „modifier site“ des Proteasoms die intrazelluläre Produktion von MHC Klasse I- Liganden z.B. des pp72 (humanes Pendant zum mCMV pp89) oder pp65 hoch regulieren könnte und somit die Effizienz der antiviralen Immunantwort stiege.

#### **4.4 Alternative Therapieregime der CMV Erkrankung**

Neben dem beschriebenen Therapieansatz ist des Weiteren eine antivirale Zytoimmuntherapie denkbar, die in klinischen Studien nach Gabe von antiviralen CD8+ T- Lymphozyten eine reduzierte Inzidenz der Posttransplantations- CMV- Erkrankung bewirkte (Riddell 1992). Selbstverständlich ist auch eine klassische Vakzinierung zur Induktion einer spezifischen T- Zellantwort in Erwägung zu ziehen. Eine Deletion von Immunescape Genen könnte in Form eines neuen Impfvirus eine erhöhte Präsentation antigener Peptide nach sich ziehen (Reddehase 2002). Das im Rahmen dieser Arbeit benutzte Mausmodell sollte auch für die aufgezählten Ausblicke wissenschaftlicher Untersuchungen die notwendige Grundlage darstellen.

## Zusammenfassung

Das Proteasom ist eine ATP- abhängige Protease, die sich aus vielen Untereinheiten zusammensetzt. Es ist unter anderem für die Generierung der MHC Klasse I- restringierten Peptide verantwortlich, die nach Komplexbildung mit spezifischen MHC Klasse I- Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Nicht- funktionelle Proteine, die als so genannte defective ribosomal products (DRIP) bezeichnet werden, stellen eine wichtige Quelle für die Generierung von antigenen Peptiden, insbesondere jedoch von viralen Peptiden dar. Der Abbau von polyubiquitinierten Proteinen durch das 26S Proteasom ist Grundlage für die Generierung von MHC Klasse I- Liganden. Allerdings ist weiterhin unklar, ob virale Proteine zwingend einer Ubiquitinierung bedürfen, um vom 26S Proteasom erkannt und abgebaut zu werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Proteasom- abhängige Abbau des mCMV ie pp89 Proteins vor allem hinsichtlich einer potentiellen Ubiquitinierung untersucht werden. Die Generierung des pp89 Epitops bzw. des 11mer Precursors wurde bislang für synthetische pp89 Peptide (21-40mere) untersucht. Um den physiologischen Bedingungen näher zu kommen, wurden Konstrukte sowohl für ein rekombinantes pp89 (rek pp89) als auch für ein ODCpp89 Fusionsprotein entworfen. Somit konnten der *in vitro* Abbau dieser Proteine durch das Proteasom und die Prozessierung des spezifischen MHC Klasse I- restringierten H-2L<sup>d</sup> Epitops bzw. des 11mer Precursors verfolgt werden. Experimente zum *in vivo* Abbau des endogen exprimierten pp89 und zum Nachweis einer potentiellen Ubiquitinierung wurden mit stabil transfizierten Mausfibroblasten (B8 Zellen) durchgeführt.

Die experimentellen Daten sprechen für einen schnellen *in vitro* Abbau des rek pp89 durch das 20S Proteasom. Das rekombinante Protein weist eine partielle Faltung auf, etwa 41% der Sekundärstrukturelemente lassen sich antiparallelen  $\beta$ - Faltblättern zuordnen. Für das pp89 Epitop spezifische CTL Assays weisen auf die Generierung des korrekten MHC Klasse I- Epitops bzw. dessen 11mer Precursorpeptids hin. Das ODCpp89 Fusionsprotein wurde in Anwesenheit von Antizym durch 26S Proteasomen verdaut. Auch in diesem Falle konnten mit dem CTL Assay das 9mer Epitop bzw. das 11mer Peptid des pp89 nachgewiesen werden. Eine mögliche Ubiquitinierung des pp89 wurde *in vivo* in Zellkulturen untersucht. Nach Gabe von Proteasomeninhibitoren zu Mausfibroblasten konnte eine starke Akkumulierung von Ubiquitin- Konjugaten beobachtet werden. Allerdings wurden auch nach radioaktiver Markierung des pp89 mit <sup>35</sup>S Methionin und anschließender Immunopräzipitation mit polyklonalen  $\alpha$ pp89- Antikörpern keine pp89- Ubiquitin- Konjugate beobachtet. Demzufolge ist für die Generierung des viralen MHC Klasse I- restringierten Epitops des mCMV pp89 ein Proteasom- abhängiger, aber Ubiquitin- unabhängiger Abbauweg denkbar.

## Bibliographie

**Ahn K, Erlander M, Leturcq D, Peterson PA, Früh K, Yang Y.**

In vivo characterization of the proteasome regulator PA28. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 18237-18242

**Akopian TN, Kisselev AF, Goldberg AL.**

Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 1791-1798

**Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL, Welch WJ.**

Identity of the 19S „prosome“ particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 1988; 331: 192-194

**Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E.**

The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 1998; 92: 367-380

**Benaroudj N, Goldberg AL.**

PAN, the proteasome-activating nucleotidase from archaeobacteria, is a protein-unfolding molecular chaperone. *Nat. Cell. Biol.* 2002; 2: 833-839

**Beninga J, Rock KL, Goldberg AL.**

IFN- $\gamma$  can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 18734-18742

**Ben-Shahar S, Cassouto B, Novak L, Porgador A, Reiss Y.**

Production of a specific major histocompatibility complex class I-restricted epitope by ubiquitin-dependent degradation of modified ovalbumin in lymphocyte lysate. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(34): 21060-21066

**Ben-Shahar S, Komlosch A, Nadav E, Shaked I, Ziv T, Admon A, De Martino GN, Reiss Y.**

26S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(31): 21963-21972

**Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R.**

The Proteasome. *Ann. Rev. Biophys. Struct.* 1999; 28: 295-317

**Böhm G, Muhr R, Jaenicke R.**

Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* 1992; 5: 191-195

**Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaupt G, Koszinowski UH, Kloetzel PM.**

Interferon- $\gamma$  stimulation modulates the proteolytic activity and the cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 901-909

**Brannigan JA, Dodson G, Duggleby HJ, Moddy PCE, Smith JL, Tomchick DR, Murzin AG.**

A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 1995; 378: 416-419

**Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M.**

The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell. Biol.* 1999; 1: 221-226

**Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL, Goldberg AL.**

26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* 2001; 20(10): 2357-2366

**Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ.**

A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 1989; 243: 1576-1583

**Chiechanover A, DiGiuseppe J, Bercovich B, Orian A, Richter JD, Schwartz AL, Brodeur GM.**

Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88: 139-143

**Ciechanover A, Schwartz AL.**

The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad function of protein death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 2727-2730

**Coffino P.**

Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2001; 2: 188-194

**Coux O, Tanaka K., Goldberg AL.**

Structure and function of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 1996; 65: 801-847

**Dahlmann B, Kopp F, Kuehn L, Niesel B, Pfeifer G, Hegerl R, Baumeister W.**

The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaebacteria. *FEBS Lett.* 1989; 251: 125-131

**Dahlmann B, Kuehn L, Ishiura S, Tsukahara T, Sugita H, Tanaka K, Rivett AJ, Hough RF, Rechsteiner M, Mykles DL.**

The multicatalytic proteinase: a high- Mr endopeptidase. *Biochem. J.* 1988; 255: 750-751

**del Val M, Hengel H, Hacker H, Hartlaub U, Ruppert T, Lucin P, Koszinowski UH.**

Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide loaded major histocompatibility complex class-I molecules into the medial-Golgi compartment. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 729-738

**del Val M, Munch K, Reddehase MJ, Koszinowski UH.**

Presentation of CMV immediate-early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. *Cell* 1989; 58: 305-315

**del Val M, Schlicht HJ, Ruppert T, Reddehase MJ, Koszinowski UH.**

Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighbouring residues in the protein. *Cell* 1991; 66: 1145-1153

**del Val M, Volkmer H, Rothbard JB, Jonjic S, Messerle M, Schickedanz J, Reddehase MJ, Koszinowski UH.**

Molecular basis for cytolytic T-lymphocyte recognition of the murine cytomegalovirus immediate-early protein pp89. *J. Virol.* 1988; 62: 3965-3972

**Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M.**

A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 7059-7061

**Dick LR, Aldrich C, Jameson SC, Moomaw CR, Pramanik BC, Doyle CK, DeMartino GN, Bevan MJ, Forman JM, Slaughter CA.**

Proteolytic processing of ovalbumin and  $\beta$ -galactosidase by the proteasome to yield antigenic peptides. *J. Immunol.* 1994; 152:3884

**Dick TP, Nussbaum AK, Deeg M, Heinemeyer W, Groll M, Schirle M, Keilholz W, Stevanovic S, Wolf DH, Huber R, Rammensee HG, Schild, H.**

Contribution of proteasomal  $\beta$ -subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 25637-25646

**Dick TP, Ruppert T, Groettrup M, Kloetzel PM, Kuehn L, Koszinowski UH, Stevanovic S, Schild HJ and Rammensee HG.**

Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 1996; 86: 253-256

**Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M.**

Purification of an 11S regulator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 22369-22377

**Eggers M, Boes B, Ruppert T, Kloetzel PM, Koszinowski UH.**

The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 1865-1870

**Falk K, Röttschke O, Stevanovic S, Jung q, Rammensee HG.**

Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991; 351: 290

**Falk K, Röttschke O.**

Consensus motifs and peptide ligands of MHC class I molecules. *Semin. Immunol.* 1993; 5: 81

**Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL.**

Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 1995; 268: 726-731

**Ferrington DA, Sun H, Murray KK, Costa J, Williams TD, Bigelow DJ, Squier TC.**

Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20S proteasome. *J. Biochem.* 2001; 276: 937-943

**Fruh, K, Ahn, K, Djaballah H, Sempe P, van Endert PM, Tampe R.**

A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* 1995; 375: 415-418

**Fu H, Doelling JH, Arendt C, Hochstrasser M, Vierstra R.**

Molecular organization of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 1998; 149: 677-692

**Gaczynska M, Rock KL, Spies T, Goldberg AL.**

Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91:9213-9217

**Geginat G, Ruppert T, Hengel H, Holtappels R, Koszinowski UH.**

IFN $\gamma$  is a prerequisite for optimal antigen processing of viral peptides in vivo. *J. Immunol.* 1997; 158: 3303-3310

**Ghoda L, van Daalen Wetters T, Macrae M, Ascherman D, Coffino P.**

Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. *Science* 1989; 243: 1493-1495

**Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cieka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D.**

A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP 9-Signalosome and eIF3. *Cell* 1998b; 94: 615-623

**Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D.**

The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 1998a; 18: 3149-3162

**Grant EP, Michalek MT, Goldberg AL, Rock KL.**

Rate of antigen degradation by the ubiquitin-proteasome pathway influences MHC class I presentation. *J. Immunol.* 1995; 155: 3750-3758

**Griffin TA, Nandi D, Cruz M, Fehling HJ, van Kaer I, Monaco J, Colbert RA.**

Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )-inducible subunits. *J. Exp. Med.* 1998; 197: 97-104

**Groettrup M, Ruppert T, Kuehn L, Seeger M, Standera S, Koszinowski UH, Kloetzel PM.**

The interferon- $\gamma$ -inducible 11S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20S proteasome in vitro. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 23808-23815

**Groettrup M, Soza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, Rammensee HG, Koszinowski UH, Kloetzel PM.**

A role for the proteasome regulator PA28 $\alpha$  in antigen presentation. *Nature* 1996; 381(6578): 166-180

**Groettrup M, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM.**

The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 94: 8970-8975

**Groll M, Bajorek M, Köhler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickmann MH, Finley D.**

A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* 2000; 7: 1062-1067

**Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R.**

Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997; 386: 463-471

**Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf D.**

The active sites of the eukaryotic 20S proteasome and their involvement in the subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 25200-25209

**Hengel H, Flohr T, Hammerling GJ, Koszinowski UH, Momburg F.**

Human cytomegalovirus inhibits peptide translocation into the ER for MHC class I assembly. *J. Gen. Virol.* 1996; 77: 2287-2296

**Hershko A, Ciechanover A.**

The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; 67: 425-479

**Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J.**

Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 1995; 375: 411-415

**Hirai S, Kawasaki H, Yaniv M, Suzuki K.**

Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain. *FEBS* 1991; 287: 57-61

**Hochstrasser M.**

Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 1996; 30: 405-439

**Jariel-Encontre I, Pariat M, Martin F, Carillo S, Salvat C, Piechaczyk M.**

Ubiquitinylation is not an absolute requirement for degradation of c-Jun protein by the 26S proteasome. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(19): 11623-11627

**Jones TR, Wiertz EJ, Sun L, Fish KN, Nelson JA, Ploegh HL.**

Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 11327-11333

**Kalejta RF, Shenk T.**

Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 3263-3268

**Kisselev AF, Kaganovich D, Goldberg AL.**

Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 22260-22270

**Kisselev AF, Akopian TN, Castillo V, Goldberg AL.**

Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol. Cell.* 1999; 4: 395-402

**Kisselev AF, Akopian TN, Goldberg AL.**

Ranges of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasins. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 1982-1989

**Kloetzel PM.**

Antigen Processing by the Proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2001; 2: 179-187

**Knowlton JR, Johnston SC, Whitby FG, Realini C, Zhang Z, Rechsteiner M, Hill CP.**

Structure of the proteasome activator REG $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ). *Nature* 1997; 390: 639-643

**Knuehl C, Spee P, Ruppert T, Kuckelkorn U, Henklein P, Neefies J, Kloetzel PM.**

The murine cytomegalovirus pp89 immunodominant H-2Ld epitope is generated and translocated into the endoplasmic reticulum as an 11-mer precursor peptide. *J. Immunol.* 2001; 167(3): 1515-1521

**Kohler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL, Finley D.**

The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol. Cell.* 2001; 7: 1143-1152

**Kopp F, Dahlmann B, Hendil KB.**

Evidence indicating that the human proteasome is a complex dimer. *J. Mol. Biol.* 1993; 229: 14-19

**Kopp F, Dahlmann B, Kuehn L.**

Reconstitution of hybrid proteasomes from purified PA700-20S complexes and PA28 $\alpha$  activator: ultrastructure and peptidase activities. *J. Mol. Biol.* 2001; 313: 465-471

**Kopp F, Hendil KB, Dahlmann B, Krisetensen P, Sobek A, Uerkvitz W.**

Subunit arrangement in the human 20S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 2939-2944

**Kuckelkorn U, Antunes Ferreira E, Drung I, Liewer U, Kloetzel PM, Theobald M.**

The effect of the interferon- $\gamma$  inducible processing machinery on the generation of a naturally tumor-associated human cytotoxic T lymphocyte epitope within a wild type and mutant p53 sequence context. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32: 1368-1375

**Kuckelkorn U, Ruppert T, Strehl B, Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Lamer S, Prinz I, Drung I, Kloetzel PM, Kaufmann SHE, Steinhoff U.**

Link between organ-specific antigen processing by 20 proteasomes and CD8 $^{+}$  T cell mediated autoimmunity. *J. Exp. Med.* 2002; 195: 983-990

**Kuehn L, Dahlmann B.**

Proteasome activator PA28 and its interaction with the 20S proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; 329: 87-96

**Lam YA, Pickardt CM, Alban A, Landon M, Jamieson C, Ramage R, Mayer RJ, Layfield R.**

Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97(18): 9902-9906

**Lam YA, Xu W, DeMartino GN, Cohen RE.**

Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature* 1997; 385: 737-740

**Lehner PJ, Karttunen JT, Wilkinson GW, Cresswell P.**

The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transported associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 6904-6909

**Löwe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R.**

Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at a 3.4Å resolution. *Science* 1995; 268: 533-539

**Lucchiari-Hartz M, Lindo V, Hitziger N, Gaedicke S, Saveanu L, Endert PM, Greer F, Eichmann K, Niedermann G.**

Differential proteasomal processing of hydrophobic and hydrophilic protein regions: Contribution to cytotoxic T lymphocyte epitope clustering in HIV-1-Nef. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100(13): 7755-7760

**Lucchiari-Hartz M, van Endert PM, Lauvau G, Maier R, Meyerhans A, Mann D, Eichmann K, Niedermann G.**

Cytotoxic T lymphocyte epitopes of HIV-1 Nef: generation of multiple definite MHC class I ligands by proteasomes. *J. Exp. Med.* 2000; 191: 239-252

**Ma CP, Slaughter CA, DeMartino GN.**

Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S proteasome (macropain). *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 10515-10523

**Madden DR.**

The three dimensional structure of peptide MHC complexes. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13: 587-622

**Meiners S, Laule M, Rother W, Guenther C, Prauke I, Muschick P, Baumann G, Kloetzel PM, Stangl K.**

Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circulation* 2002; 105: 483-489

**Michalek MT, Grant EP, Gramm C, Goldberg AL, Rock KL.**

A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 1993; 363: 552-554

**Michalek MT, Grant EP, Rock KL.**

Chemical denaturation and modification of ovalbumin alters its dependence on ubiquitin conjugation for class I antigen presentation. *J. Immunol.* 1996; 157: 617-624

**Miller CL, Pintel DJ.**

The NS2 protein generated by the parvovirus minute virus of mice is degraded by the proteasome in a manner independent of ubiquitin chain elongation or activation. *Virology* 2001; 285: 346-355

**Morel S, Levy F, Burlet-Schiltz O, Brasseur F, Probst-Keppler M, Peitrequin AL, Monsarrat V, van Velthoven R, Cerottini JC, Boon T, Gairin JE, van den Eynde BJ.**

Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 2000; 12: 107-117

**Murakami Y, Matsufuji S, Hayashi S, Tanahashi N, Tanaka K.**

Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem. & Biophys. Research. Commun.* 2000; 267: 1-6

**Murakami Y, Matsufuji S, Hayashi SI, Tanahashi N, Tanaka K.**

ATP-dependent inactivation and sequestration of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome are prerequisites for degradation. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19(10): 7216-7227

**Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi SI, Igarashi K, Tanaka K.**

Ornithine Decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 1992; 360: 597-599

**Neefjes J.J, Gottfried E, Roelse J, Grommé, Obst R, Hämmerling GJ, Momburg F.**

Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 1133

**Neisig A, Roelse J, Sijts AJ, Ossendorp F, Feltkamp MC, Kast WM, Melief CJ, Neefjes JJ.**

Major differences in transporter associated with antigen processing (TAP) - dependent translocation of MHC class I presentable peptides and the effect of flanking sequences. *J. Immunol.* 1995; 154: 1273-1279

**Niedermann G, Geier E, Lucchiari-Hartz M, Hitziger N, Ramsperger A, Eichmann K.**

The specificity of proteasomes: impact on MHC class I processing and presentation of antigens. *Immunol. Rev.* 1999; 172: 29-48



**Orlowski M, Cardozo C, Michaud C.**

Evidence for the present of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral aminoacids. *Biochem.* 1993; 32: 1563-1572

**Orlowski M, Wilk S.**

Catalytic activities of the 20S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Archives of Biochem. and Biophys.* 2000; 383: 1-16

**Pamer E & Cresswell P.**

Mechanisms of MHC class I- restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 323-358

**Pickart C & van Denmark AP.**

Opening doors into the proteasome. *Nat. Struct. Biol.* 2000; 7: 999-1001

**Princiotta MF, Finzi D, Qian SB, Gibbs J, Schuchmann S, Buttgerit F, Bennink JR, Yewdell JW.**

Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 2003; 18(3): 343-354

**Realini C, Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M.**

Molecular cloning and expression of a  $\gamma$ -interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 20727-20732

**Rechsteiner M, Realini C, Ustrell V.**

The proteasome activator 11S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem. J.* 2000; 345: 1-15

**Rechsteiner M, Rogers SW.**

PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 1996; 21(7): 267-271

**Reddehase MJ, Koszinowski UH.**

Redistribution of critical major histocompatibility complex and T cell receptor-binding function of residues in an antigenic sequence after biterminal substitution. *Eur. J. Immunol.* 1991; 21: 1697-1701

**Reddehase MJ, Rothbard JB, Koszinowski UH.**

A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature* 1989; 337: 651-653

**Reddehase MJ.**

Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2: 831-844

**Reusch U, Muranyi W, Lucin P, Burgert HG, Hengel H, Koszinowski UH.**

A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J.* 1999; 18(4): 1081-1091

**Riddell S, Watanabe KS, Goddard JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD.**

Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by adoptive transfer of T- cell clones. *Science* 1992; 257: 238-241

**Rock KL&Goldberg AL.**

Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Ann. Rev. Immunol.* 1999; 17: 739-779

**Rock KL, Gramm C, Rothstein K, Clark R, Stein L, Dick D, Hwang D, Goldberg AL.**

Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell Immunol.* 1994; 78: 761-771

**Rubin DM, van Nocker S, Glickman M, Coux O, Wefes I, Sadis S, Fu H, Goldberg AL, Vierstra R, Finley D.**

ATPase and ubiquitin-binding proteins of the yeast proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 1997;24: 17-26

**Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM.**

The E6 Oncoprotein encoded by HPV 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-1136

**Schmidt M, Klotzel PM.**

Biogenesis of eukaryotic proteasomes: the complex maturation pathway of a complex enzyme. *FASEB J.* 1997; 11: 1235-1243

**Schmidtke G, Emch S, Groettrup M, Holzhütter HG.**

Evidence for the existence of a non-catalytic modifier site of peptide hydrolysis by the 20 S proteasome. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(29): 22056-22063

**Schmidtke G, Holzhütter HG, Bogyo M, Kairies N, Groll M, de Giuli R, Emch S, Groettrup M.**

How an inhibitor of the HIV-I protease modulates proteasome activity. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 35734–35740

**Schmidtke G, Kraft R, Kostka S, Henklein P, Frömmel C, Löwe J, Huber R, Klotzel PM, Schmidt M.**

Analysis of mammalian proteasome biogenesis: the maturation of  $\beta$ -subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO J.* 1996; 15: 6887–6898

**Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bannink JR.**

Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 2000; 404: 770–774

**Schwarz K, van Den BM, Kostka S, Kraft R, Soza A, Schmidtke G, Klotzel PM, Groettrup M.**

Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28  $\alpha/\beta$ , enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. *J. Immunol.* 2000; 165: 768–778

**Seemüller E, Lupas A, Stock D, Löwe D, Huber R, Baumeister W.**

Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* 1995; 268: 579–582

**Seifert U, Marañón C, Shmueli A, Desoutter JF, Wesoloski L, Janek K, Henklein P, Diescher S, Andrieu M, de la Salle H, Weinschenk T, Schild H, Laderach D, Galy A, Haas G, Klotzel PM, Reiss Y, Hosmalin A.**

An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.* 2003; 4: 375–379

**Shaeffer JR, Kania MA.**

Degradation of monoubiquitinated alpha-globulin by 26S proteasomes. *Biochem.* 1995; 34: 4015–4021

**Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, Smitherman M, Roberts JM, Clurman BE.**

Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1ubiquitination. *Mol. Cell.* 2000; 5: 403–410

**Shimbara N, Ogawa K, Hidaka Y, Nakajima H, Yamasaki N, Niwa S, Tanahashi N, Tanaka K.**

Contribution of proline residue for efficient production of MHC class I ligands by proteasomes. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(36): 23062–23071

**Sijts A, Sun Y, Janek K, Kral S, Paschen A, Schadendorf D, Klotzel PM.**

The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol. Immunol.* 2002; 39:165–169

**Sijts AJ, Ruppert T, Rehmann B, Schmidt M, Koszinowski U, Klotzel PM.**

Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J. Exp. Med.* 2000 (b); 191: 503–514

**Sijts AJ, Ständer S, Toes REM, Ruppert T, Beekman NJ, van Veelen PA, Ossendorp FA, Melief CJ, Klotzel PM.**

MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *J. Immunol.* 2000 (a); 164: 4500–4506

**Stohwasser R, Salzmann U, Giesebrecht J, Klotzel PM, Holzhütter HG.**

Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 6221–6230

**Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schroter C, Thompson MW, Hersh LB, Kalbacher H, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild, H.**

Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.* 2000; 1(5): 413–418

**Sun Y, Sijts A, Song M, Kanek K, Nussbaum AK, Kral S, Schirle M, Stevanovic S, Paschen A, Schild HJ, Klotzel PM, Schadendorf D.**

Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells. *Canc. Res.* 2002; 62: 2875–2882

**Tanaka K.**

Breakthroughs and Views: Molecular Biology of the Proteasome. *Biochem & Biophys Research Comm.* 1998; 247: 537–541

**Tarsca E, Szymanska G, Lecker S, O' Connor CM, Goldberg AL.**

Ca<sup>++</sup>-free Calmodulin and Calmodulin Damaged by in Vitro Aging Are Selectively Degraded by 26 S Proteasomes without Ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(27): 20295–20301

**Thrower JS, Hoffmann L, Rechsteiner M, Pickart C.**

Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 2000; 19: 94–102

**Toes RE, Nussbaum A, Rammensee HG, Schild H.**

Discrete Cleavage Motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* 2001;194: 1-12

**Treier M, Staszewski LM, Bohmann D.**

Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* 1994; 78: 787-798

**Turner GC, Varshavsky A.**

Detecting and measuring cotranslational protein degradation in vivo. *Science* 2000; 289: 2117-2120

**Ustrell V, Realini C, Pratt G, Rechsteiner M.**

Human lymphoblast and erythrocyte multicatalytic protease: differential peptidase activities and responses to the 11S regulator. *FEBS letters* 1995; 376: 155-158

**van Endert PM, Riganelli G, Greco G, Fleischhauer K, Sidney J, Sette A, Bach JF.**

The peptide binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 1883

**van Hall T, Sijts A, Camps M, Offringa R, Melief C, Kloetzel PM, Ossendorp F.**

Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 483-494

**van Nocker S, Sadis S, Rubin DM, Glickman M, Fu H, Coux O, Wefes I, Finley D, Vierstra RD.**

The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 22: 383-387

**Walz J, Erdmann A, Kania M, Typke D, Koster AJ, Baumeister W.**

26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 1998; 121: 19-29

**Weissmann AM.**

Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2001; 2:169-178

**Whitby FG, Masters EI, Kramer L, Knowlton JR, Yao Y, Wang CC, Hill CP.**

Structural basis for the activation of 20S proteasome by 11S regulators. *Nature* 2000; 408: 115-120

**Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogoy M, Geuze HJ, Ploegh HL.**

The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 1996; 84: 769-779

**Yewdell JW & Bennink JR.**

Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17: 51-88

**Zhang M, Thurig S, Tsirigotis M, Wong PKY, Reuhl KR, Gray DA.**

Effects of Mutant Ubiquitin on ts1 Retrovirus-Mediated Neuropathology. *J. Virol.* 2003; 77: 7193-7201

**Ziegler H, Thale R, Lucin P, Muranyi W, Flohr T, Hengel H, Farrell H, Rawlinson W, Koszinowski UH.**

A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* 1997; 6: 57-66

## **Danksagung**

Zunächst gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. Peter M. Kloetzel, der mir einerseits die Möglichkeit eröffnet hat, in seiner Arbeitsgruppe diese Dissertation anzufertigen.

Andererseits möchte ich mich auf diesem Wege auch für seine ständige Diskussionsbereitschaft und Toleranz hinsichtlich meiner durch das parallele Studium bedingten zeitlichen Einschränkungen erkenntlich zeigen.

Mein persönlicher Dank richtet sich aber auch im Besonderen an Frau Dr. Ulrike Kuckelkorn, die mir als Betreuerin über die Jahre mit viel Engagement, Zeit und Geduld zur Seite stand, ohne ihre aufopferungsvolle Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihre zahlreichen Ideen und praktischen Tipps waren zu jeder Zeit von herausragendem Wert.

Des Weiteren richtet sich mein Dank an das gesamte Team der Arbeitsgruppe, das ich aufgrund der freundlichen Umgangsformen und ausgesprochenen Hilfsbereitschaft sehr schätzen gelernt habe. Exemplarisch sei an dieser Stelle Frau Ilse Drung und Herrn Dirk Licht für ihre experimentellen Hilfestellungen, Frau Dr. Beate Braun für die Bereitstellung der 26S Proteasomen, Frau Dr. Ulrike Salzmann und Dr. Ulrike Seifert für die Einführung in den pp89 CTL assay, Frau Dr. Katharina Janek für die MS- Analysen und Frau Dr. Andrea Soza für die praktische Einarbeitung in das Thema gedankt.

Des Weiteren sei auch dankend auf Herrn Dr. Hartmut Hengel für die Bereitstellung der pp89 Antikörper, auf Dr. Bohmann und Dr. Murakami für die Überlassung der Plasmide und Herrn Dr. Peter Henklein für die Synthese der Peptide verwiesen.

## Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Antje Voigt  
Geburtsdatum, -ort: 25. 08. 1976, Stendal  
Anschrift: Rathenower Straße 74  
10559 Berlin  
Telefon: + 49 / (0) 30 / 44653738; + 49 / (0) 171 / 5709085;  
Email: antje.voigt@gmx.de  
Staatsangehörigkeit: Bundesrepublik Deutschland  
Familienstand: ledig

### Ausbildung

#### Schulausbildung:

09/91 - 08/93 Bismarckgymnasium Genthin  
09/93 - 08/94 Southmoreland Senior High School Alverton, Pennsylvania, USA  
High School Diploma  
09/94 - 07/96 Bismarckgymnasium Genthin  
07/96 Allgemeine Hochschulreife (Gesamtnote 1,0)

#### Studium:

seit 10/96 Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin,  
Medizinische Fakultät Charité  
08/98 Ärztliche Vorprüfung (Gesamtnote 2,0)  
08/99 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 1,0)  
04/01 USMLE (United States Medical Licensing Examination) Step 1  
(Score 239)  
03/02 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 1,0)  
04/02 USMLE (United States Medical Licensing Examination) Step 2  
(Score 211)  
04/03 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 1,0)

### Förderungen

11/98- 12/00 Studentische Forschungsförderung der Charité, HU Berlin

**Erklärung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben, die vorliegende Dissertation stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar.

.....

Antje Voigt

Berlin, 15.09.2003